

**Universidade de São Paulo**  
**Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto**  
**Departamento de Genética**

**FABIO RICARDO PABLOS DE SOUZA**

**Polimorfismo dos genes *MUC1* e Osteopontina  
em novilhas da raça Nelore (*Bos taurus indicus*)**

**Ribeirão Preto**

**2007**

**FABIO RICARDO PABLOS DE SOUZA**

**Polimorfismo dos genes *MUC1* e Osteopontina  
em novilhas da raça Nelore (*Bos taurus indicus*)**

Tese apresentada ao Departamento de Genética da  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para  
obtenção do título de Doutor em Ciências  
Biológicas

Área de concentração: Genética

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Lúcia Regina Martelli

**Ribeirão Preto**

**2007**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Souza, Fábio Ricardo Pablos

Polimorfismo dos genes *MUC1* e Osteopontina em novilhas da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) / Fábio Ricardo Pablos de Souza; orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lúcia Regina Martelli. Ribeirão Preto, 2007.  
91f.: fig.

Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Genética - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Orientadora: Martelli, Lúcia R.

1- Nelore, 2- VNTR, 3- MUC1, 4- Osteopontina, 5- taxa de gestação, 6- DEP

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Fabio Ricardo Pablos de Souza

Título: Polimorfismo dos genes *MUC1* e Osteopontina em novilhas da raça Nelore  
(*Bos taurus indicus*)

Tese apresentada ao Departamento de Genética da  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para  
obtenção do título de Doutor em Ciências  
Biológicas  
Área de concentração: Genética.

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof. <sup>(a)</sup> Dr. <sup>(a)</sup> \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. <sup>(a)</sup> Dr. <sup>(a)</sup> \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. <sup>(a)</sup> Dr. <sup>(a)</sup> \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. <sup>(a)</sup> Dr. <sup>(a)</sup> \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. <sup>(a)</sup> Dr. <sup>(a)</sup> \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

***ALBERGUES***

Não, não tenho mais o medo de deixar os lugares  
De velejar outros ares, de respirar profundamente outros mares...

Para onde eu estiver indo, as coisas, boas ou ruins  
Estarão indo comigo, e se acharem em mim um abrigo

Eu já não me esqueço que me albergarei em outros  
endereços, corações e pessoas

Essas sim, somente boas sementes, amigas, amigos!!!

**Nicolas Guto**

*Dedico*

*a meus pais, que sempre  
me apoiaram em todas  
as conquistas.*

## ***AGRADECIMENTOS***

À Deus, pela vida, saúde e condições a mim concedidas.

À Profª. Drª. Lúcia Regina Martelli, pelas valiosas sugestões, orientação, amizade e exemplo de profissionalismo.

Ao Prof. Raysildo Barbosa Lôbo, pelo apoio e colaboração no desenvolvimento do trabalho.

Ao Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, pelas facilidades oferecidas na execução do trabalho e pelo ensino de excelência.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de Estudos.

Ao Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX), pelo auxílio financeiro na compra de materiais.

À Profª Maria Vanderly Andréa e ao Médico Veterinário Argeu Silveira, por fornecerem as amostras e os dados para o trabalho.

À equipe do Laboratório de Fertilização *in Vitro*, Reginaldo Aparecido Vila e Marli Vani Galerani, pelo auxílio técnico na preparação das amostras.

À equipe técnica do Grupo de Genética, e Melhoramento Animal e Computação (GEMAC), Luiz Antônio F. Bezerra, Sebastião Paulo F. Bezerra, Marco P. Corrado, pelo auxílio, acesso aos arquivos e cessão de dados.

À Associação Nacional de Criadores e Pesquisadores (ANCP), pelos auxílios financeiros a congressos e organização de eventos.

À Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência (FAEPA), pelos auxílios financeiros concedidos para a apresentação de trabalhos e compra de materiais.

Aos colegas Pedro Alejandro Vozzi e Jéferson Nomelini, pelo auxílio nas análises estatísticas.

À todos os funcionários do bloco C.

Aos meus amigos e colegas do pensionato Vita et Pax.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ester Silveira Ramos e ao técnico Sílvio Avelino dos Santos pela amizade, apoio e atenção dispensadas.

À todos os amigos e colegas do bloco C e do Departamento de Genética, pelos momentos de descontração e convivência.

À minha família, pelo apoio, auxílio e amor.

À minha namorada Arione Augusti Boligon, pelo constante incentivo, amor, companhia e carinho.



Este trabalho foi realizado com apoio financeiro do Programa de Excelência Acadêmica da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (PROEX/CAPES), Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX CNPq), e Associação Nacional de Criadores e Pesquisadores (ANCP).

## ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS</b> .....	3
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	6
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	7
<b>I.INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>I.1. Marcadores moleculares</b> .....	12
<b>I.2. A implantação embrionária</b> .....	13
<b>I.3. As Mucinas</b> .....	15
<b>I.3.1. Glicoproteína MUC1</b> .....	16
<b>I.3.2. Papel da glicoproteína MUC1 endometrial na implantação embrionária</b> .....	19
<b>I.3.3. O polimorfismo genético da glicoproteína MUC1</b> .....	20
<b>I.4. A Glicoproteína osteopontina</b> .....	22
<b>I.4.1. A osteopontina na implantação embrionária</b> .....	24
<b>I.4.2. Osteopontina bovina</b> .....	25
<b>I.5. Diferenças esperado da progênie (DEPs)</b> .....	26
<b>II.OBJETIVOS</b> .....	28
<b>III.MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	30
<b>III.1. Amostra</b> .....	31
<b>III.2. Metodologia</b> .....	31
<b>III.2.1. Coleta de sangue periférico</b> .....	31
<b>III.2.2. Extração de DNA genômico</b> .....	32
<b>III.2.3. Reação de PCR para análise do polimorfismo do VNTR no gene MUC1</b> .....	33
<b>III.2.4. Seqüenciamento e análise do número de repetições do VNTR nos produtos de PCR do gene MUC1</b> .....	33
<b>III.2.5. PCR para amplificação e análise do SNP do gene SPPI</b> .....	35
<b>III.2.6. Análise estatística</b> .....	36
<b>III.2.6.1. Freqüência alélica (f)</b> .....	36
<b>III.2.6.2. Freqüência genotípica (F)</b> .....	36
<b>III.2.6.3. Conteúdo de polimorfismo informativo (PIC)</b> .....	37
<b>III.2.6.4. Heterozigosidade (H)</b> .....	37
<b>III.2.6.5. Diversidade genética (h)</b> .....	37
<b>III.2.6.6. Análise da associação do polimorfismo MUC1 com o diagnóstico de gestação</b> .....	38
<b>III.2.6.7. ANOVA para polimorfismo MUC1 com os valores das diferenças esperadas da progênie</b> .....	38
<b>IV.RESULTADOS</b> .....	40
<b>IV.1. Caracterização do polimorfismo genético MUC1 na raça Nelore</b> .....	41
<b>IV.2. Seqüenciamento do VNTR do gene MUC1</b> .....	44
<b>IV.3. Análise de associação entre os genótipos do gene MUC1 e o diagnóstico de gestação em novilhas Nelore</b> .....	47
<b>IV.4. Análise de variância (ANOVA) do polimorfismo MUC1 e as diferenças esperadas na progênie (DEPs)</b> .....	52
<b>IV.5. Polimorfismo SNP no íntron 4 do gene SPPI</b> .....	57
<b>V.DISSCUSSÃO</b> .....	59
<b>VI.CONCLUSÕES</b> .....	65
<b>VII.REFERÊNCIAS</b> .....	67
<b>ANEXOS</b> .....	iv
<b>MANUSCRITO</b> .....	x

***ABREVIATURAS***

AOL= área de olho de lombo

AFLP= polimorfismo de comprimento dos fragmentos amplificados

BMP15= “bone morphogenetic protein -15”

DEP= diferença esperada na progênie

DNA= ácido desoxirribonucleico

EG= espessura de gordura subcutânea entre a 12<sup>a</sup> e a 13<sup>a</sup> costelas

EGP8= espessura de gordura subcutânea medida da garupa

dNTP= deoxirribonucleotídeo trifosfato

F= frequência genotípica

f= frequência alélica

FIV = fertilização *in vitro*

GRGDS= glicina – arginina - glicina-ácido aspártico - serina

H= heterozigosidade

h= diversidade genética

HUGO/GNC= “Human Genome Organization / Gene Nomenclature Committee”

IPP= idade ao primeiro parto

Kb= quilo base

KDa= quilo dalton

MFGM= membrana do glóbulo de gordura do leite

MUC1 = mucina polimórfica MUC1

NES= asparagina – ácido glutâmico – serina

P120= peso aos 120 dias

P365= peso aos 365 dias

P450= peso aos 450 dias

PA= peso adulto

PAC= produtividade acumulada

PAS= “periodic acid – Schiff’s”

pb= pares de base

PCR= reação em cadeia da polimerase

PE365= perímetro escrotal aos 365 dias

PE450= perímetro escrotal aos 450 dias

PEM= mucina epitelial polimórfica

PG= período de gestação

PIC= conteúdo de polimorfismo informativo

PMGRN= Programa de Melhoramento Genético da Raça Nelore

PTS= prolina-treonina serina

PUM= mucina polimórfica urinária

QTL= loco para característica quantitativa

RAPD= polimorfismo de DNA amplificados aleatoriamente

RGD= arginina-glicina-ácido aspártico

RFLP= polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição

RPM= rotações por minuto

RS= arginina - serina

SAM= seleção assistida por marcadores

SNP= polimorfismo de nucleotídeo simples

SEA= sea urchin sperm protein, enterokinase and agrin

SEEK= serina – ácido glutâmico – ácido glutâmico – lisina

TE= transferência de embrião

TGF $\beta$ 1= “transforming growth factor – beta 1”

TNF $\alpha$ = “tumor necrose factor – alfa”

VNTR= número variável de repetições em tandem

## **LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1.</b> Frequências alélicas (f), genotípicas (F), valores de heterozigosidade (H), conteúdo de polimorfismo informativo (PIC) e diversidade genética (DG) do VNTR do gene <i>MUC1</i> em 56 novilhas da raça Nelore do 1º grupo.....	43
<b>Tabela 2.</b> Frequências gênicas (f) e genotípicas (F), heterozigosidade (H), PIC e diversidade genética (DG) do VNTR do gene <i>MUC1</i> em 253 novilhas da raça Nelore do 2º grupo.....	44
<b>Tabela 3.</b> Frequências alélicas (f) e genotípicas (F) do polimorfismo do gene <i>MUC1</i> obtidas das novilhas gestantes e não gestantes da amostra do 2º grupo (N=232).....	47
<b>Tabela 4.</b> Tabela de contingência para frequência genotípica do gene <i>MUC1</i> .....	49
<b>Tabela 5.</b> Tabela de contingência para frequência gênica do gene <i>MUC1</i> .....	50
<b>Tabela 6.</b> Frequências alélicas (f) e genotípicas (F) do gene <i>MUC1</i> nas amostras de 132 novilhas gestantes do 1º e 2º grupo, e nas amostras de 156 novilhas não gestantes do 2º grupo.....	51
<b>Tabela 7.</b> Médias das DEPs e desvios padrões para cada tipo de genótipo do gene <i>MUC1</i> em 279 novilhas da raça Nelore.....	53
<b>Tabela 7.</b> (continuação).....	54
<b>Tabela 7.</b> (continuação).....	55
<b>Tabela 8.</b> Valores de <i>p</i> obtidos da análise de variância do gene <i>MUC1</i> com os valores das diferenças esperadas na progênie de 279 novilhas do 1º e do 2º grupo.....	56

## **LISTA DE FIGURAS**

- Figura 1.** Esquema do fragmento amplificado da seqüência (GenBank: gi|62084752) do gene da osteopontina de *Bos taurus* com seus sítios de restrição para a enzima *Dde I*.....36
- Figura 2.** Gel de agarose 1,5% mostrando os produtos de PCR do gene *MUC1* de 10 amostras de DNA provenientes de novilhas da raça Nelore.....41
- Figura 3.** Frequências alélicas (f) do gene *MUC1* na amostra estudada.....42
- Figura 4.** VNTR *MUC1* em bovinos da raça Nelore.....46
- Figura 5.** Frequências alélicas (f) do gene *MUC1* em novilhas gestantes e não gestantes do 2º grupo.....48
- Figura 6.** Frequências genotípicas (F) do gene *MUC1* em gestantes e não gestantes.....49
- Figura 7.** Frequências alélicas (f) do gene *MUC1* das amostras de novilhas gestantes do 1º e 2º grupo e das amostras de novilhas não gestantes do 2º grupo.....51
- Figura 8.** Região amplificada do gene *SPPI* correspondente ao íntron 4 de 9 amostras de novilhas gestantes do 2º grupo.....58

## RESUMO

A MUC1 (*MUC1*) e a osteopontina (*SPPI*) são glicoproteínas expressas na superfície luminal uterina com funções na proteção e adesão celular. A MUC1 possui função antiadesiva, enquanto a osteopontina desempenha função adesiva. A expressão de ambas é regulada pelo hormônio esteróide progesterona. Durante a fase receptiva do útero, a MUC1 é inibida por este hormônio, enquanto a osteopontina é estimulada. O objetivo deste trabalho é caracterizar o polimorfismo genético destas moléculas e analisar a associação entre o polimorfismo, o diagnóstico de gestação e as diferenças esperadas na progênie (DEP) de várias características em novilhas da raça Nelore (*Bos taurus indicus*). A amostra foi constituída por 309 novilhas procedentes de duas fazendas participantes do Programa de Melhoramento Genético da Raça Nelore (PMGRN). A amostra da primeira fazenda incluiu 56 novilhas prenhas e foi utilizada para caracterização do polimorfismo e da estrutura do número variável de repetições em tandem (VNTR) *MUC1* na raça Nelore. A segunda amostra foi constituída por 76 novilhas com resultado positivo de gestação e 156 com resultado negativo de gestação e foi utilizada para caracterização do polimorfismo dos genes *MUC1* e *SPPI* na raça Nelore, assim como para análise da associação entre os polimorfismos e os fenótipos. O gene *MUC1* apresentou 5 alelos constituídos por um VNTR formado por uma seqüência de 60 nucleotídeos. A seqüência da repetição *consensus* foi idêntica às seqüências descritas em caprinos e em *Bos taurus taurus*. Descrevemos a seqüência de uma terceira repetição *consensu* na raça Nelore. O alelo 1 apresentou 10 repetições, o alelo 2 apresentou 12 repetições, o alelo 3 apresentou 15 repetições, o alelo 4 foi formado por 18 repetições, e o alelo 5 apresentou 24 repetições. O alelo com menor número de repetições apresentou a maior freqüência, sendo 0,70 na amostra do 1º grupo e 0,80 na amostra do 2º grupo. Os alelos 2, e 3 tiveram a segunda e terceira maior freqüência, sendo seguidos pelos alelos 4 e 5. A análise estatística não evidenciou associação entre o polimorfismo do gene *MUC1* e o diagnóstico de gestação e entre o polimorfismo e os valores das diferenças esperadas na progênie das características consideradas economicamente importantes. Na amostra referente às novilhas da segunda fazenda, não identificamos o polimorfismo de nucleotídeo simples no íntron 4 (T/C) do gene *SPPI* da osteopontina, como descrito na raça Holandesa. Sugerimos que a ausência deste polimorfismo possa constituir uma característica específica em *Bos taurus indicus*. Porém, dada a associação já descrita entre polimorfismo do gene *SPPI* e características de crescimento, não descartamos a hipótese de que, assim como o *MUC1*, tenha ocorrido uma seleção indireta devido aos critérios aplicados pelo Programa de Melhoramento Genético da Raça Nelore.



## ***ABSTRACT***

MUC1 (*MUC1*) and osteopontin (*SPPI*) are glycoproteins expressed in the uterine luminal surface with predict functions in protection and cell adhesion. MUC1 has anti-adhesive role and osteopontin has adhesive role. The expression of both molecules is regulated by the steroid hormone, progesterone. During the receptive period for embryo implantation in the uterus, MUC1 is inhibited by progesterone and the osteopontin is stimulated. The objective of this work is to characterize the genetic polymorphism of these molecules, and to characterize associations between the polymorphisms, gestation rate and the expected progeny difference (EPD) in the Nelore breed (*Bos taurus indicus*). The study group comprised 309 heifers derived from two participating farms of the Nelore Cattle Breeding Program (PMGRN). The first farm provided 56 fertile female for the study for the characterization of the *MUC1* polymorphism and the variable number of tandem repeats (VNTR) genomic structure in the Nelore breed. The second farm contributed 76 heifers with confirmed gestation and 156 no-pregnant female that were used to characterize both gene polymorphisms and to analyze the association between the *MUC1* and *SPPI* polymorphisms and the phenotypes. The *MUC1* gene presented five alleles caused by length differences generated by a VNTR of 60 nucleotides. The consensus repeat sequence was identical to the caprine and *Bos taurus taurus* sequence. In this study we described the sequence of the third consensus repeat in the Nelore breed. Allele 1 presented with 10 repeats, allele 2 presented with 12 repeats, allele 3 presented with 15 repeats, allele 4 had 18 repeats and allele 5 had 24 repeats. Allele 1 had the smallest size and was the most frequent (0.70) in the group 1 and 0.80 in the group 2. Alleles 2 and 3 were the next most frequent followed by alleles 4 and 5. The  $\chi^2$  test showed that the polymorphism was not significantly associated with the diagnostic of gestation and the EPD values. In this Nelore study group it was not possible to identify the single nucleotide polymorphism (T/C) of the *SPPI* gene previously described in Holstein breed. The absence of this polymorphism could be specific to the Nelore cattle. However, considering the correlation between the *SPPI* polymorphism and growth parameters, an indirect selection could happen due to the established criteria within the Nelore Cattle Breeding Program.

# ***I.INTRODUÇÃO***

A implantação do embrião no endométrio da cavidade uterina é um dos períodos mais críticos da gestação. A falha de implantação pode resultar de anormalidades relacionadas aos gametas, ao embrião, ao trato genital ou aos níveis hormonais. Em humanos, a infertilidade de causa desconhecida ou sem causa aparente afeta 10 a 15% dos casais que procuram tratamento por técnicas de reprodução assistida (HENRIQUES et al., 2006).

Em bovinos, a técnica de Fertilização In Vitro (FIV) não é utilizada como tratamento de infertilidade, e sim como meio de reprodução para implemento de animais com características de interesse econômico. A taxa de gestação varia de 45 a 55% para embriões congelados e atinge 62.5% para não congelados. Estes valores indicam que o fator embrionário contribui significativamente para a redução da taxa de gestação em bovinos (GALIMBERT et al., 2001).

Muitos fatores têm sido associados à falha de implantação, como por exemplo, o ambiente uterino, a qualidade do embrião e a diversidade dos procedimentos laboratoriais (NARDO ET AL., 2002). Em relação ao ambiente uterino, várias moléculas associadas ao processo de receptividade uterina e implantação foram descritas na última década. Dentre as mais importantes estão a osteopontina, as citocinas, CSF-1, a interleucina-1, as integrinas e a mucina MUC1 (BORTHWICK et al., 2003; KAO et al., 2002; GIUDICE, 1999).

Atualmente, a pesquisa genômica busca a identificação de genes e alelos relacionados ao processo de implantação embrionária, visando aumentar a eficiência das técnicas de FIV em humanos e em animais domésticos, assim como aperfeiçoar os processos de seleção de animais com alta capacidade reprodutiva em programas de melhoramento genético via Seleção Assistida por Marcadores (SAM) (BORTHWICK et al., 2003; WOMACK, 2005).

A mucina MUC1 é uma molécula expressa normalmente no endométrio da cavidade uterina com a função de lubrificar e proteger o trato reprodutivo contra infecções por microorganismos patogênicos. Sua expressão é controlada pelo hormônio progesterona, esteróide essencial para o início da gestação (CARSON et al., 1998).

A osteopontina é uma molécula expressa pelos epitélios glandular e luminal uterino sob controle regulatório da progesterona. Sua função no histotrofo uterino é mediar a ligação entre moléculas adesivas do tipo integrinas, moléculas expressas tanto nas células superficiais da trofoectoderme do blastocisto, como no epitélio luminal uterino (JOHNSON et al., 2001).

A fertilidade é uma importante característica de produção, mas os poucos registros, a baixa herdabilidade devido à influência de fatores ambientais como saúde e nutrição, torna-a uma característica de difícil estudo (ANDERSSON, 2001). Dessa forma, os genes das moléculas MUC1 e osteopontina podem ser considerados como genes candidatos para associação com características de fertilidade, como taxa de gestação em vacas submetidas à monta natural, produção de embriões por fertilização in vitro ou taxa de transferência de embriões (TE) (JOHNSON et al., 2001).

### ***1.1. Marcadores moleculares***

Em bovinos, existem duas estratégias principais para identificação de genes relacionados a uma característica: testes de associação com genes candidatos ou “screening” por marcadores anônimos obtidos por técnicas de RFLP (polimorfismos de comprimento do fragmento de restrição), AFLP (polimorfismos de comprimento dos fragmentos amplificados) e RAPD (polimorfismos de DNA amplificados aleatoriamente). A pesquisa genômica em rebanhos bovinos foca principalmente a identificação de locos

ligados a características multifatoriais como crescimento, produção de leite e qualidade da carne. A expressão de uma característica multifatorial envolve um conjunto de genes que contribuem para o fenótipo em proporção variável. Tais características sofrem ainda grande influência de fatores ambientais. (ANDERSSON, 2001; POLINELI et al., 2006).

Em bovinos, a análise de genes para características monogênicas recebe atenção diferente da aplicada a humanos e outros modelos experimentais, onde o objetivo principal é identificar genes de processos fisiológicos relacionados a doenças. Em animais domésticos, esses genes tendem a ser eliminados antes dos animais portadores chegarem à idade reprodutiva. Por outro lado, o acúmulo de conhecimento sobre genes relacionados a doenças e vias metabólicas em humanos tornou-se um poderoso suporte para os estudos de associação de algumas características em bovinos. Um grande exemplo é o gene da proteína miostatina, responsável pela musculatura dupla em bovinos da raça Belgian Blue, Charolês e Piemontês (ANDERSSON, 2001; BELLINGE et al., 2005).

Em caprinos, o gene *BMP15* e *Boorola* são exemplos de genes com elevado efeito na reprodução de fêmeas. Ambos estão associados a uma elevada taxa de ovulação (ANDERSSON, 2001).

O *MUC1* e *SPPI* são genes associados ao processo de implantação embrionária por sua relação com o processo de adesão célula-célula. Ambos possuem a expressão gênica uterina controlada pelo principal hormônio da gestação, a progesterona. A glicoproteína MUC1, com função anti-adesiva, é inibida pelo hormônio, enquanto a osteopontina, com papel adesivo, é estimulada pela progesterona (JOHNSON et al., 2001).

## ***1.2. A implantação embrionária***

A implantação do blastocisto no útero é um avanço evolutivo associado com a viviparidade necessária para sustentar uma nutrição eficiente e a proteção do concepto durante a gestação. Devido à recente evolução deste processo, há uma grande variedade de tipos de implantação entre os mamíferos. Apesar desta diversidade de estratégias de implantação e de placentação, os eventos iniciais que ocorrem entre a trofoectoderme do blastocisto e o epitélio luminal uterino maternal são similares em muitas espécies (SPENCER et al., 2004).

A implantação embrionária pode ser definida como o contato e fixação do embrião ao tecido materno. Embora a implantação possa ocorrer em qualquer tecido, em condições normais, o processo acontece no endométrio da cavidade uterina durante um curto período chamado “janela de implantação” ou receptividade uterina (PERRIER D’HAUTERIVE et al., 2002). Caso o processo não ocorra neste período, o útero entra em “fase refratária”, na qual o organismo materno rejeita e destrói o blastocisto (TABIBZADEH, 1998).

Baseado no esquema comparativo proposto por Guillomot e colaboradores, (1981) as fases da implantação incluem: a liberação do blastocisto da zona pelúcida, o pré-contato e orientação do blastocisto, aposição, adesão e invasão endometrial. Em ruminantes, o processo de invasão não ocorre e as fases do processo são a liberação do blastocisto da zona pelúcida, pré-contato e orientação do blastocisto, aposição e adesão. O estágio de pré-contato é caracterizado pelo alongamento do blastocisto de uma forma esférica e tubular, para uma forma alongada. A adesão inicial entre trofoectoderme com o epitélio uterino é feita pelo contato entre moléculas de adesão e seus receptores. A adesão que culminará com a formação da placenta é realizada pelo sincício híbrido feto-maternal, formado a partir da junção das células trofoblásticas binucleadas com as células do epitélio uterino. Durante o processo de placentação, este tecido híbrido se associa à superfície caruncular do epitélio endometrial formando o placentoma (SPENCER et al., 2004).

Os primeiros estágios da gestação de bovinos é caracterizado pelo reconhecimento materno da gravidez, via secreção de interferon-tau pelo embrião. O interferon-tau inibe a degeneração do corpo lúteo, e com isso, a liberação do hormônio esteróide progesterona na corrente sanguínea permanece (BOWEN & BURGHARDT, 2000). No que se refere à implantação, este hormônio atua modulando a expressão uterina das moléculas sinalizadoras, adesivas e antiadesivas (SIMON et al., 2000). Na segunda semana, inicia-se o alongamento do embrião e a implantação, entre os dias 20 e 24 do ciclo estral (YAMADA et al., 2001).

### ***1.3. As Mucinas***

A família das mucinas é atualmente constituída por 14 glicoproteínas caracterizadas pela longa estrutura filamentosa, alta proporção de glicanas e abundante expressão em muitos epitélios, principalmente tecidos luminiais como trato gastro-intestinal e reprodutivo. Uma característica comum desta família é a presença de uma região repetitiva (VNTR) formada em cerca de 80 % pelos aminoácidos serina, treonina, prolina, alanina e glicina (PATTON et al., 1995). O VNTR é também conhecido como região PTS (prolina, treonina e serina) devido à alta proporção desses aminoácidos (DEKKER et al., 2002).

Durante muito tempo, a definição do termo mucina baseou-se nas características bioquímicas de algumas glicoproteínas. Esse método tornou-se insatisfatório, pois a homologia entre os genes das moléculas era baixa. Como a presença das regiões PTS está associada à seqüência polipeptídica e não às características bioquímicas da molécula, sua presença tornou-se um dos principais critérios utilizados pela Human Genome Organization / Gene Nomenclature Committee (HUGO/GNC; <http://www.hugo-international.org/hugo/>) para definir uma mucina. Com isso, foi possível isolar as modificações pós-traducionais, traçar um paralelo entre a glicoproteína e os genes e, desta

forma, definir criteriosamente uma mucina. Apesar disso, as características das mucinas de locos diferentes não são inteiramente compartilhadas, sugerindo que nestes casos, houve evolução convergente das regiões PTS (DEKKER et al., 2002).

Inicialmente, as mucinas foram associadas à proteção e à lubrificação das superfícies epiteliais. Hoje, diversos estudos descrevem funções no crescimento, no desenvolvimento fetal, na renovação e diferenciação epitelial, na integridade epitelial, carcinogênese e desenvolvimento de metástases (MONIAUX et al., 2001).

### ***1.3.1. Glicoproteína MUC1***

A mucina MUC1 é uma molécula expressa de maneira codominante em mamíferos. Também pode ser chamada de mucina polimórfica epitelial (polymorphic epithelial mucin - PEM), mucina urinária polimórfica (polymorphic urinary mucin – PUM), epsialina e antígeno DF3. Dentre as mucinas, foi a primeira a ter seu gene clonado e seqüenciado (HANISCH & MÜLLER, 2000).

Em humanos, o gene está localizado no cromossomo 1 na região 1q21 e é formado por 6 íntrons e 7 éxons que, dependendo do VNTR localizado no 2º éxon, pode variar de 4 a 7 Kb (HEY et al., 2003). O promotor contém vários sítios de ligação para reguladores de transcrição, dentre eles o NF-kB para TNF $\alpha$ , o receptor de estrogênio e o receptor de progesterona (GENDLER, 2001).

A proteína possui três isoformas: MUC1-transmembrana, MUC1-secretada e MUC1-Y. A forma secretada não possui o domínio transmembrana e a MUC1-Y não possui a região repetitiva. A glicoproteína transmembrana é formada por uma cauda citoplasmática fosforilada de 72 aminoácidos com sítios sinalizantes, por uma região transmembrana hidrofóbica, por um domínio SEA (Sea urchin sperm protein, Enterokinase and Agrin),



todos altamente conservados, e por um longo domínio extracelular de 1000 a 2000 aminoácidos formado pela repetição em tandem (VNTR) de 20 aminoácidos (DURASAMY et al., 2006).

Assim como a maioria das mucinas, a região repetitiva possui alta porcentagem de resíduos de serina, treonina, prolina, alanina e glicina. As hidroxilas dos aminoácidos de serina e treonina das regiões repetitivas na mucina MUC1 transmembrana são os sítios para a O-glicosilação da proteína. Os aminoácidos de prolina formam uma extensa molécula, fazendo-a chegar bem acima da superfície celular. O pequeno tamanho dos resíduos de glicinas e alaninas, também encontrados nestes sítios, pode estar relacionado à aproximação das enzimas glicosilantes de seus sítios de O-glicosilação. (PATTON et al., 1995).

Imediatamente após a tradução, a molécula sofre uma modificação proteolítica, que a cliva a 58 aminoácidos acima do domínio transmembrana. As duas partes da molécula permanecem unidas por forças não covalentes, dando origem à MUC1 transmembrana. A razão para a glicoproteína se apresentar na forma heterodimérica na superfície celular ainda é desconhecida, mas é possível que esta condição estabeleça um mecanismo rápido para liberação do domínio extracelular, dando origem à MUC1 na sua forma secretada (GENDLER, 2001).

Embora a sequência peptídica da proteína seja idêntica em diferentes tecidos, as formas glicosiladas maduras são diferentes, com níveis de glicosilação variando entre 50% a 80%. A glicosilação não depende somente do tecido que expressa a MUC1, mas também dos tipos de glicosiltransferases expressas no tecido. Aplin e colaboradores, (1998) demonstraram que a glicosilação histo-específica garantia a função adesiva ou anti-adesiva da molécula.

Na superfície celular, a molécula chega a atingir cerca de 200 nm, sendo que a maioria dos receptores não excede 35 nm. Acredita-se que este excesso de comprimento,

junto à alta densidade proporcionada pela O-glicosilação, poderia prejudicar o processo de adesão pelo efeito de “steric hindrance” que causa repulsão entre as células. Wesseling e colaboradores, (1995;1996) demonstraram que moléculas chave na cascata de adesão celular, como e-caderinas e integrinas, poderiam ter sua função inibida por esse efeito da glicoproteína MUC1. No caso das e-caderinas, o grau de adesão célula-célula apresentava uma graduação correspondente ao número de repetições no VNTR MUC1, na qual, quanto maior o número de repetições, menor o grau de adesão entre as células.

Alternativamente, pela O-glicosilação histo-específica com estruturas sialil-Lewis e heparan sulfato, que servem como ligantes de selectinas, a MUC1 poderia facilitar o processo de adesão entre as células. As moléculas de sialil-Lewis e heparan sulfato são expressas normalmente na superfície de células do sistema imune e da trofoectoderme do embrião (WESSELING et al., 1996; APLIN et al., 1998).

Em bovinos, o gene da mucina MUC1 localiza-se no cromossomo 3 entre a região 9260.656 e 9256.555 e, como nos humanos, é formado por 6 íntrons e 7 éxons, podendo atingir cerca de 7 KBs de extensão ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

A MUC1 bovina é bem caracterizada e é também conhecida pelo nome PAS, por afinidade com o reagente “periodic acid-Schiff’s”. Na raça “Danish Holstein” a molécula completa é formada por 580 aminoácidos, dos quais 22 aminoácidos da cauda N-terminal originam a seqüência peptídeo sinal. Após a clivagem da seqüência peptídeo sinal, a seqüência de 558 aminoácidos pode ser dividida em 3 domínios: uma cauda intracelular fosforilada constituída por 70 aminoácidos, um domínio transmembrana hidrofóbico e um longo domínio extracelular. No domínio extracelular encontra-se o domínio SEA constituído por 120 aminoácidos e o VNTR formado por repetições de 20 aminoácidos (PALLESEN et al., 2001).

### ***1.3.2. Papel da glicoproteína MUC1 endometrial na implantação embrionária***

O trato reprodutivo feminino é revestido por uma mucosa que, como qualquer outra, deve inibir a ação de agentes tóxicos e infecciosos. Além do papel protetor, o útero também deve fornecer um ambiente propício para a implantação do embrião e seu desenvolvimento. O período no qual o útero permite a implantação do embrião é denominado janela de implantação. Este período é transitório e controlado pela ação de hormônios esteróides ovarianos. No período não-receptivo, o útero não está funcionalmente hábil para permitir a implantação do embrião (BRAYMAN et al., 2004).

As primeiras suspeitas do envolvimento da molécula MUC1 no processo de implantação do embrião surgiram a partir de trabalhos que relatavam a distribuição da molécula pelo endométrio de camundongos e sua inibição durante a fase receptiva do ciclo estral (BRAGA & GENDLER, 1993).

Atuando como uma das principais glicoproteínas da superfície do lúmen do endométrio, a MUC1 é freqüentemente comparada com uma barreira anti-adesiva entre as células da trofoectoderme do embrião e as células luminais do epitélio uterino. Em humanos e macacos-pregos (*Cebus apella*) sugere-se que a maior expressão da glicoproteína na tuba uterina seja um dos fatores responsáveis pela inibição da implantação ectópica. Outra hipótese seria que, de acordo com a espécie estudada, ou com o tipo de tecido, a molécula poderia assumir função adesiva ou anti-adesiva, conforme o tipo de glicosilação e assim, favorecer o processo de implantação. (HEY et al., 2003; JONES et al., 2001).

Estudos de expressão gênica da MUC1 endometrial nas fases do ciclo uterino e estágios iniciais da gestação em vários mamíferos demonstraram que a expressão uterina difere entre as espécies. Estudos experimentais em ratos (*Rattus norvegicus*), porcos (*Sus scrofa*), babuínos (*Papio anubis.*), macacos-pregos (*Cebus apella*) e ovelhas (*Ovis aries*)

revelaram a ausência ou redução da MUC1 durante a fase de implantação. Por outro lado, em humanos e coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), relatou-se aumento nos níveis da MUC1 por toda superfície luminal uterina (APLIN et al., 2001).

Outro fator divergente dentro desses dois modelos é o controle regulatório da progesterona. Em humanos e coelhos, a elevada taxa de progesterona foi associada com a expressão positiva da MUC1, enquanto que, nos outros mamíferos estudados tal condição associa-se à ausência ou menores índices de expressão da glicoproteína (JONHSON et al., 2001; HOFFMAN et al., 1998; DE SOUZA et al., 1999; BOWEN et al., 1996; HILD-PETITO et al., 1996; SURVEYOR et al., 1995; HEY et al., 1994).

Assim mesmo, em humanos e em coelhos existe uma inibição de alguns domínios da glicoproteína nos arredores dos sítios de implantação. Isto revela a existência de um mecanismo de regulação negativa mediada por sinais provenientes de blastocistos maduros. Apoiado nesta evidência, foi sugerido um mecanismo de rejeição maternal, que selecionaria os embriões aneuplóides e/ou incapazes de produzirem o sinal necessário para a inibição da MUC1. Esta hipótese é consistente com a elevada taxa de embriões anormais descritos na espécie humana e com a expressão reduzida da MUC1 descrita em mulheres com abortos espontâneos recorrentes. (MESEGUER et al., 2001; APLIN et al., 2001).

### ***1.3.3. O polimorfismo genético da glicoproteína MUC1***

Polimorfismo é definido como a ocorrência, em uma população, de dois ou mais fenótipos alternativos determinados geneticamente, devidos a diferentes alelos, considerando que o alelo menos freqüente não pode ser mantido por mutação repetida. Um loco é definido como polimórfico se o alelo raro tem uma freqüência mínima de 0,01 (1%)

e, conseqüentemente, os heterozigotos para tal alelo ocorrem com uma freqüência de pelo menos, 2% (PASSARGE, 2004).

O polimorfismo da MUC1 pode referir-se a isoformas originadas por eventos de “splicing” alternativo, processamento em nível de proteína, às diferentes formas de glicosilação ou, mais comumente ao polimorfismo do VNTR (HANISCH & MÜLLER, 2000).

Considerando os polimorfismos genéticos do VNTR, grande parte dos trabalhos realizados tiveram como objetivo a associação dos alelos com o processo de desenvolvimento, invasão e metástase de células cancerígenas. Os alelos de maior tamanho já foram associados à susceptibilidade e a um pior prognóstico para adenocarcinoma de pulmão e também ao desenvolvimento de condições que precedem o carcinoma gástrico, como metaplasia intestinal completa e gastrite crônica atrófica (MITSUTA et al., 2005; SILVA et al., 2001). Ando e colaboradores, (1998) relataram uma maior predisposição à acne severa em pacientes com alelos de maior comprimento.

A relação do polimorfismo do VNTR com a infertilidade feminina se apóia na relação da MUC1 com a implantação embrionária. Horne e colaboradores., (2001) e Goulart e colaboradores, (2004) realizaram estudos de associação do polimorfismo genético *MUC1* com infertilidade feminina de causa desconhecida. No primeiro trabalho, foi observado que as mulheres férteis apresentavam os alelos com maior número de repetições. No entanto, Goulart e colaboradores, (2004) não encontraram diferença significativa entre os dois grupos.

Em animais domésticos, como bovinos, ovelhas e caprinos (*Capra hircus*) as análises de polimorfismo do VNTR no gene *MUC1* têm por objetivo sua associação com o tamanho do glóbulo de gordura do leite, e com isso, à fração de nata. Antes que as gotículas de lipídios sejam liberadas no leite pela membrana apical, a MUC1 forma uma membrana que

as envolve. Em bovinos europeus (*Bos taurus taurus*) da raça Italian Friesian e Piemontês a associação do polimorfismo genético foi proximamente relacionado à variação da mucina do glóbulo de gordura do leite (RASERO et al., 2002; SACCHI et al., 2004; PALLESEN et al., 2001).

Em humanos, o tamanho dos alelos varia de 1000 a mais de 5000 pares de base, com número de repetições de aproximadamente 20 e 125 repetições (HORNE et al., 2001). Em ruminantes, foram descritos ao todo 20 alelos, sendo 15 em 6 diferentes raças de caprinos e 4 em 2 raças de bovinos europeus. Em caprinos, os alelos apresentam tamanhos de 1500 a 3000 pares de base e em bovinos de 778 a 1600 pares de base (SACCHI et al., 2004; RASERO et al., 2002).

Assim como em outras espécies, o VNTR do gene *MUC1* em bovinos é formado por uma repetição “em tandem” de uma seqüência *consensu* de 60 nucleotídeos. Em vários mamíferos, essa seqüência varia de 80 a 100% de homologia no mesmo VNTR, assim como o VNTR pode variar quanto ao número de repetições. A única espécie de mamífero, cuja região repetitiva do gene *MUC1* não varia no número de repetições é o camundongo, com 16 repetições (*Mus musculus*). Nesta espécie ainda é observado uma diminuição da homologia entre as seqüências para 75 % (HORNE et al. 2001; SACCHI et al. 2004).

#### ***1.4. A Glicoproteína osteopontina***

Primeiramente isolada do osso, a osteopontina pode também ser encontrada em células epiteliais, em secreções do trato gastrointestinal, rins, tiróide, mama, útero, placenta e testículo (FRANZEN & HEINEGARD, 1985; BROWN et al., 1992; JONHSON et al., 1999; LUEDTKE et al., 2002). Também é expressa em células musculares lisas e células metastáticas (MALYANKAR et al, 2000; HOTTE et al., 2002). Sua função está

relacionada à adesão célula-célula, aumento da comunicação entre a célula e matriz extracelular, migração das células imunes, osteócitos e células tumorais, mineralização tecidual e deposição de fosfato de cálcio no osso, dentre outras (JONHSON et al., 2003).

A osteopontina é uma glicoproteína de 264 a 301 aminoácidos, que sofre vários tipos de modificações pós-traducionais, como a fosforilação nos resíduos de serina e treonina, O-glicosilação, sulfatação e clivagem. Após o processamento, a massa molecular da molécula pode variar de 25 a 75 kDa. Suas principais características são uma seqüência líder hidrofóbica, um sítio com resíduos consecutivos de asparagina para ligação de cálcio-fosfato-apatita, uma seqüência GRGDS para adesão, um sítio de clivagem para trombina e duas glutaminas que podem servir como substratos para transglutaminases na ligação da molécula com outras macromoléculas (BUTLER et al., 1996).

A seqüência de aminoácidos RGD (arginina-glicina-ácido aspártico) interage com receptores integrinas, as glicoproteínas dominantes nas cascatas de adesão. Estas pertencem a uma família de receptores glicoprotéicos transmembrana heterodiméricos, compostos por duas subunidades ligadas por ligações não covalentes, a subunidade  $\alpha$  e a subunidade  $\beta$ . As integrinas estão presentes na superfície das células onde mediam adesão, migração e diferenciação celular (RUOSLAHTI & PIERSCHBACHER, 1987).

O gene da osteopontina, *SPPI*, em humanos está localizado no cromossomo 4, agrupado junto a outros genes de proteínas ligantes de integrinas que incluem a sialoproteína óssea, proteína I da matriz dentina, dentina sialofosfoproteína e fosfoglicoproteína de matriz extracelular (FISHER et al., 2001).

O gene *SPPI* contém um elemento de resposta para a progesterona em sua região 5' e além de sua transcrição ser controlada por este hormônio esteróide, também pode ser controlada por outras moléculas como a interleucina 1 $\alpha$  e  $\beta$ , TGF $\beta$ -1, interferon  $\gamma$  e estrogênio (CRAIG & DENHARDT, 1991; OMIGBODUN et al., 1997).

O gene codificante da osteopontina foi clonados em várias espécies, incluindo ratos (*Rattus norvegicus*), camundongos (*Mus musculus*), humanos (*Homo sapiens*), vacas (*Bos taurus*), galinhas (*Gallus gallus*), coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) e ovelhas (*Ovis aries*) (OLDBERG et al., 1986; KIEFER et al., 1989; KERR et al., 1991; MOORE et al, 1991; TEZUKA et al., 1992; JONHSON et al., 1999)

As sequências altamente conservadas em todas essas espécies incluem 4 dos 9 ou 10 resíduos do sítio poliaspártico, a seqüência GRGDS, 15 resíduos de serina que inclui a seqüência SSEEK, três resíduos de treonina, uma seqüência NES (asparagina – ácido glutâmico – serina) e duas glutaminas. Duas características compartilhadas por ovinos e bovinos são uma deleção de 22 aminoácidos e a troca de RS (arginina - serina ) por KS (lisina – serina) no sítio de clivagem (BUTLER et al., 1996).

#### ***1.4.1. A osteopontina na implantação embrionária***

O epitélio luminal uterino é formado por uma camada superficial polarizada que é normalmente não-adesiva. Esta característica é perdida durante a cascata de adesão que permite o processo de adesão entre as células do trofoblasto e epitélio luminal uterino para a implantação do embrião. Entre os fatores que permitem a adesão desses dois tipos de células estão as moléculas adesivas encontradas no histotrofo uterino. O histotrofo é uma substância secretada pelo epitélio uterino glandular no período secretório do ciclo menstrual. O histotrofo é constituído por enzimas, fatores de crescimento, citocinas, hormônios, proteínas de transporte e outras substâncias. O histotrofo também possui função na nutrição embrionária, produção de sinais de reconhecimento da gravidez, imunoproteção e placentação. Em ovelhas, o histotrofo é essencial para manter a gestação no período peri-implantação, quando o concepto precisa aderir à superfície epitelial do



lúmen uterino. Dentre os componentes do histotrofo uterino está a glicoproteína osteopontina, que pode ligar-se a integrinas expressas na superfície das células do embrião e epitélio uterino luminal. Na espécie humana, a expressão de integrinas do tipo  $\alpha v\beta 3$  e  $\alpha 4\beta 1$  varia com ciclo uterino e define a janela de implantação. A expressão alterada dessas integrinas foi associada a diversas condições relacionadas à infertilidade feminina (JONHSON et al., 2003).

A expressão uterina de osteopontina no período peri-implantação é detectada em humanos, porcos e coelhos, indicando que a molécula está envolvida na implantação de muitos mamíferos apesar dos diversos tipos de implantação e placentação. Em ovelhas, a osteopontina também é secretada no lúmen uterino pelo epitélio glandular uterino no qual liga-se a receptores de integrinas expressos na trofoectoderme do embrião. Esta interação pode induzir a mudanças na morfologia da trofoectoderme e mediar a adesão entre o epitélio luminal e a trofoectoderme, essencial para a implantação e placentação (GARLOW et al., 2002; JONHSON et al., 1999).

#### ***1.4.2. Osteopontina bovina***

O gene *SPPI* está localizado no cromossomo 6 e é formado por 6 éxons atingindo cerca de 7 kb de DNA genômico. O cDNA compreende uma molécula de 1356 nucleotídeos com uma matriz de leitura aberta de cerca de 834 nucleotídeos, codificando uma proteína de 278 aminoácidos. Uma diferença da osteopontina bovina das outras espécies é um intervalo de 22 aminoácidos que representa um domínio ligante para  $Ca^{2+}$ . Apesar da variabilidade entre as espécies, a molécula apresenta várias regiões conservadas que incluem uma seqüência líder hidrofóbica, um potencial sítio de glicosilação de resíduo

de asparagina, um extenso sítio poliaspártico, e o trípetídeo arginina- glicina- ácido aspártico (GRGDS) para ligações adesivas entre células (KERR et al. 1991).

Estudos de expressão da osteopontina na glândula mamária e a identificação de um QTL 4 cM próximo do gene da osteopontina afetando a porcentagem de proteína do leite levou Leonard e colaboradores, (2005) a investigar uma possível associação entre variações no gene e a produção de leite na raça holandesa. Na amostra foi descrito um polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP – single nucleotide polymorphism) no íntron 4 do gene *SPP1*. A substituição de uma timina por uma citosina foi associada com o aumento da porcentagem protéica e de gordura no leite. A frequência de cada um dos alelos foi de aproximadamente 0.50.

### ***1.5. Diferenças esperado da progênie (DEPs)***

As DEPs estimam a metade do valor genético do animal, ou seja, o efeito aditivo médio (A) dos genes de um animal transmitidos à sua prole por meio de seus gametas (PEREIRA, 2004).

No Programa de Melhoramento Genético da Raça Nelore (PMGRN ) são realizadas avaliações genéticas periódicas para 13 características que podem ser divididas em 5 classes: precocidade sexual, reprodução, crescimento, carcaça e tempo de permanência no rebanho (LÔBO et al., 2006).

Na classe de precocidade sexual, a característica de probabilidade de prenhez precoce (3P) expressa a probabilidade de uma novilha conceber precocemente até 15 meses, manter a gestação e parir um bezerro vivo. A classe reprodução é formada pelas características de idade ao primeiro parto (IPP), período de gestação (PG), produtividade acumulada (PAC) e perímetro escrotal aos 365 e aos 450 dias (PE365/PE450). Na classe

crescimento, estão as características de habilidade maternal direta e indireta (P120/MP120), pesos aos 365 e aos 450 dias (P365/P450) e peso adulto (PA). As DEPS P120, MP120, P210 e MP210 implementam a habilidade maternal na progênie e aumentam a taxa de crescimento dos bezerros. A DEP peso adulto (PA) está relacionada à velocidade de crescimento da progênie e com isso, o custo de manutenção dos animais. A classe carcaça é composta pelas DEPs: área de olho de lombo (AOL), que mede o rendimento da carcaça, a espessura de gordura subcutânea entre a 12ª e a 13ª costela (EG), que está relacionada à camada de gordura de cobertura da carcaça e a espessura de gordura subcutânea medida na garupa (EGP8), relacionada a precocidade de acabamento da carcaça. A classe tempo de permanência no rebanho é formada pela DEP de stayability que prediz a capacidade da progênie fêmea permanecer mais tempo na produção de bezerros no rebanho. É medida pelo parto de até três bezerros em 76 meses de idade (LÔBO et al., 2006).

### ***1.6. Justificativa do projeto***

Considerando o pequeno número de informações na literatura sobre o gene *MUC1* e *SPPI* em bovinos e a escassez de trabalhos sobre marcadores moleculares para características ligadas a fertilidade e para DEPs dessas características, a proposta do presente trabalho é analisar a relação dos genes *MUC1* e *SPPI* com o diagnóstico de gestação e com as diferenças esperadas na progênie avaliadas pelo PMGRN.

## ***II. OBJETIVOS***

**Principal:**

Analisar a associação entre o polimorfismo dos genes *MUC1* e *SPP1* com o diagnóstico de gestação e as diferenças esperadas na progênie para características de interesse econômico em novilhas participantes do Programa de Melhoramento Genético da Raça Nelore (PMGRN).

**Intermediários:**

- (1) Caracterizar o polimorfismo do gene *MUC1* em novilhas da raça Nelore;
- (2) Comparar a frequência dos alelos do gene *MUC1* com o diagnóstico de gestação das novilhas;
- (3) Caracterizar a estrutura da região repetitiva (VNTR) *MUC1* na raça Nelore.
- (4) Caracterizar o polimorfismo SNP do gene *SPP1* em novilhas da raça Nelore.

# ***III. MATERIAL E MÉTODOS***

### ***III.1. Amostra***

A amostra incluiu dois grupos de novilhas da raça Nelore procedentes de duas fazendas participantes do Programa de Melhoramento Genético da Raça Nelore – Ribeirão Preto, desenvolvido pelo Setor de Genética, Melhoramento Animal e Computação (GEMAC) do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, sob gestão da Associação Nacional de Criadores e Pesquisadores - ANCP.

O primeiro grupo foi formado por 56 novilhas, com gestação entre os 18 e 24 meses de idade, provenientes de uma fazenda localizada na cidade de São Miguel do Araguaia – GO. Não foram disponibilizadas informações sobre os touros utilizados nos acasalamentos.

O segundo grupo, proveniente de propriedade situada em Campo Grande – MS, foi formado por 253 novilhas, filhas de 35 touros participantes do PMGRN e que apresentaram os seguintes valores médios de DEP de: (a) idade ao primeiro parto (IPP) de -1,19; (b) perímetro escrotal (PE) aos 365 dias de 1,07; (c) perímetro escrotal aos 450 dias de 1,51 (Anexo 1). Este segundo grupo foi separado em seis lotes de aproximadamente 50 animais. A estação de monta abrangeu o período de 1º de dezembro de 2005 a 28 de fevereiro de 2006, e contou com a participação de 10 touros selecionados pelo PMGRN (REMC 0038, REMC 0566, REMC 0908, REMC 1208, REMC 1296, REMC 0565, REMT 3125, REMT 2721, REMT 3104 e 0553). O diagnóstico de gestação foi confirmado por ultrasonografia em 232 novilhas.

### ***III.2. Metodologia***

#### ***III.2.1. Coleta de sangue periférico***

Cerca de 4ml de sangue foram coletados da veia caudal das novilhas utilizando frascos BD Vacutaine® contendo 7.2mg K<sub>2</sub> EDTA. Após a coleta, os frascos foram

identificados com o número do animal, colocados em caixas de isopor e mantidos à 4° C para transporte, até o momento da extração de DNA.

### ***III.2.2. Extração de DNA genômico***

Foi utilizado o método rápido de Extração e Purificação de DNA com Sal descrito por Olerup & Zetterquist (1992). A composição das soluções utilizadas está descrita no Anexo 2.

Cerca de 1 ml de sangue foi homogeneizado com 450 ul de tampão de lise em microtubos de 1,5 ml. As amostras foram centrifugadas à 13.000 RPM por 20 segundos e o sobrenadante descartado. Os pellets foram homogeneizados com mais 1 ml de tampão de lise, centrifugados à 13.000 R.P.M e os sobrenadantes descartados. Este procedimento foi repetido até os “pellets” adquirirem uma coloração clara.

Os “pellets” foram então ressuspensos em 380 ul de tampão de proteinase K e incubados “overnight” à 55°C. No dia seguinte, as amostras foram homogeneizadas com 120 ul de NaCl (5M) estocadas à 4° C e centrifugadas por 5 minutos à 13.000 R.P.M.. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e a ele foi adicionado 1 ml de etanol absoluto. As amostras foram armazenadas à -20° C por 30 minutos, depois centrifugadas à 14.000 R.P.M. em centrífuga refrigerada à 4° C. Foram novamente armazenadas à -20° C por 30 minutos e centrifugadas à 14.000 R.P.M. na centrífuga refrigerada à 4° C. Posteriormente, foi adicionado 1ml de etanol 70 % estocado à 4° C e as amostras foram centrifugadas à 14.000 R.P.M. por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as amostras foram secas em “Speed Vacuum” por 45 minutos. Acrescentaram-se 50 ul de água ultrapura e a solução foi incubada em banho-maria à 37° C por uma hora. O DNA foi quantificado em espectrofotômetro com fator de diluição 100.



### ***III.2.3. Reação de PCR para análise do polimorfismo do VNTR no gene MUC1***

As seqüências dos “primers Forward e Reverse” (5'-CGC AGA ACT ACG CCA GTT TCC-3' e 5'-AGA GCG GGT GGT CAT GGA TG-3') foram baseadas na seqüência do MUC1 bovino do GenBank (AF 399757) e adaptados da seqüência de “primers” que flanqueiam a região VNTR do *MUC1* bovino publicada por Rasero e colaboradores (2002).

Cerca de 100ng de DNA genômico foram misturados à 15 pmol de cada primer em um volume final de 25 µl contendo 200 µmol de cada dNTP, 0.75 mM de MgSO<sub>4</sub>, 0.5 unidades de enzima polimerase (Platinum Pfx Taq Dna Polymerase – Invitrogen), tampão de amplificação Platinum Pfx, e solução PCR Enhancer, ambos na concentração 1X. A PCR foi realizada em um termociclador (Whatman Biometra TGradiente) sob as seguintes condições: denaturação à 95° C por 5 minutos, 35 ciclos de denaturação à 95° C por 40 segundos, 58° C para pareamento dos primers por 40 segundos e 68° C por 1 minuto e 30 segundos para extensão. A extensão final foi de 68° C por 5 minutos.

Os fragmentos amplificados foram visualizados após eletroforese em gel de agarose à 1,5% preparado com tampão TBE 0.5X com 4µL de solução de brometo de etídeo. O gel foi fotografado e o comprimento dos alelos foi estimado pelo software Kodak Digital Science 1D Image Analysis Software em comparação com o marcador (Marker 1 Kb Plus DNA Ladder).

### ***III.2.4. Seqüenciamento e análise do número de repetições do VNTR nos produtos de PCR do gene MUC1***

Os produtos de PCR foram purificados de amostras de duas novilhas homocigotas para o mesmo alelo com os kits de purificação de produtos de PCR de gel de agarose e GFX PCR DNA (Amersham Biosciences<sup>®</sup>). Para a quantificação, as amostras foram aplicadas em gel de agarose à 2% com Low DNA Mass Ladder (Invitrogen<sup>®</sup>). O sequenciamento foi realizado num MegaBACE<sup>®</sup> 1000 Analysis System (Amersham Biosciences<sup>®</sup>) com DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit (Termo Sequenase<sup>®</sup> II DNA polymerase). As seqüências foram analisadas pelo software Sequence Analyser Base Caller Cimarron 3.12. A purificação e a reação de sequenciamento foram realizadas pelo Serviço de sequenciamento e purificação de produtos de PCR do Centro de Estudos do Genoma Humano (USP, SP).

O software Chromas (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>) foi utilizado para comparar as seqüências com as seqüências do GenBank. O Programa Tandem Finder Repeat (<http://tandem.bu.edu/trf/trf.html>) foi utilizado para identificar e contar os números de repetições das seqüências (BENSON et al., 1999). Para se estimar o número de repetições dos outros alelos foi utilizada a seguinte fórmula:

$$ETR = (NCR) (NR) - (L1036bp)$$

*ETR* = Número de pares de base (pb) da seqüência não repetitiva

*NCR* = Número de pares de base da seqüência *consensu*

*NR* = Número de repetições na seqüência 1036

*L1036bp* = Comprimento em pares de base do alelo 1036

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

*X* = Alelo

*NTR* = Número de repetições

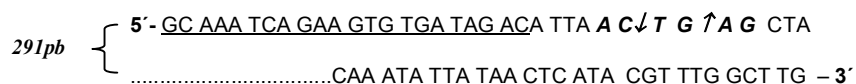
*FNS* = Comprimento do alelo em pares de base

### ***III.2.5. PCR para amplificação e análise do SNP do gene SPP1.***

Os “primers” utilizados OPNForward: GCA AAT CAG AAG TGT GAT AGA C e OPNReverse: CCA AGC CAA ACG TAT GAG TT foram baseados na sequência de “primers” descritos por Leonard e colaboradores (2005) obtidos da sequência do gene da osteopontina bovina (GenBank: NW\_255516). A amplificação do DNA genômico foi feita em uma solução com volume de 25 µL contendo aproximadamente 100 ng de DNA genômico. Cerca de 7 pmol de cada primer foram misturados a esta solução contendo 200 µmol de cada dNTP, 0.75 mM de MgSO<sub>4</sub>, 0.5 unidades de enzima polimerase (Platinum Pfx Taq Dna Polymerase – Invitrogen), tampão de amplificação Platinum Pfx, e solução PCR Enhancer, ambos na concentração 1X. A reação de PCR foi realizada em um termociclador (Whatman Biometra TGradiente) sob as seguintes condições: 95° C por 5 minutos para denaturação inicial, por uma rodada inicial de 6 ciclos com denaturação de 94° C por 45 segundos, pareamento “touchdown” de 63° C para 50° C (-2° C por ciclo) por 45 segundos e extensão à 72° C por 45 segundos. A segunda rodada foi de 24 ciclos com temperatura de denaturação de 94° C por 45 segundos, pareamento de 50° C por 45 segundos e extensão de 72° C por 45 segundos. A extensão final foi à 72° C por 7 minutos.

Os fragmentos amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose à 1,5% preparado com tampão TBE 0.5X com 4µL de solução de brometo de etídeo. O gel foi fotografado e o comprimento dos fragmentos foi estimado pelo software Kodak Digital Science 1D Image Analysis Software de acordo com o marcador (Marker 1 Kb Plus DNA Ladder).

Após comprovada a amplificação por eletroforese, cerca de 10 µL de produtos de PCR foram adicionados a uma solução com volume de 25 µL contendo tampão de enzima na concentração de 1X e cerca de 0.4 unidades de enzima *Dde I*. Esta solução foi incubada à 37° C por 8 horas no termociclador T gradiente Biômetra e logo após, cerca de 15 µL da solução foram aplicados em gel de agarose 1,5% preparado com TBE 0.5X com 4 uL de solução de brometo de etídeo. Após a eletroforese, o gel foi fotografado sob luz ultravioleta e o comprimento dos fragmentos foi estimado pelo software Kodak Digital Science 1D Image Analysis Software com o marcador (Marker 1 Kb Plus DNA Ladder).



**Figura 1.** Esquema do fragmento amplificado da sequência (GenBank: gi|62084752) do gene da osteopontina de *Bos taurus* com seus sítios de restrição para a enzima *Dde I*.

### III.2.6. Análise estatística

Foram calculados a frequência genotípica (F), erro padrão (EP), frequência alélica (f), heterozigosidade (H), conteúdo de polimorfismo informativo (PIC) pelas fórmulas abaixo.

#### III.2.6.1. Frequência alélica (f)

$$f = \frac{2N_{ii} + \sum_{i \neq j} N_{ij}}{2N}$$

#### III.2.6.2. Frequência genotípica (F)

$$F_{ii} = \frac{N_{ii}}{N}$$

$N_{ii}$  = número de indivíduos homocigotos para o alelo  $i$

$N_{ij}$  = número de indivíduos heterocigotos para o alelo  $i$

$f$  = frequência do alelo  $i$

$n$  = número total de alelos ( $i=1,2,\dots,n$ )

$N$  = número de indivíduos da amostra

### ***III.2.6.3. Conteúdo de polimorfismo informativo (PIC)***

$$PIC = 1 - \left( \sum_{i=1}^N p_i^2 \right) \sum_{i=1}^{N-1} \sum_{i \neq j}^N 2 p_i^2 p_j^2$$

$p_i$  = frequência do alelo  $i$

$p_j$  = frequência do alelo  $j$

$N$  = número amostral

### ***III.2.6.4. Heterocigosidade (H)***

$$H = 1 - \sum_i p_{o_{ii}}$$

$p_{o_{ii}}$  = frequência observada de homocigotos para o alelo  $i$ .

### ***III.2.6.5. Diversidade genética (h)***

$$h = 1 - \sum_i pe_i^2$$

$pe_i$  = frequência esperada de homozigotos para o alelo  $i$ .

#### ***III.2.6.6. Análise da associação do polimorfismo MUC1 com o diagnóstico de gestação***

Para a análise de associação entre frequências gênica e genotípica e o diagnóstico de gestação foi utilizada a amostra correspondente ao segundo grupo, contendo 232 animais com resultados de diagnóstico de gestação.

Para a análise, foram construídas duas tabelas de contingências com frequências gênicas e genotípicas, respectivamente. Para comparar os valores observados com os esperados foi utilizado o teste do  $\chi^2$ , com uso do software Microsoft Excel (Excel, 2003).

#### ***III.2.6.7. ANOVA para polimorfismo MUC1 com os valores das diferenças esperadas da progênie***

Foram utilizadas DEPs para 16 características, estimadas pelo Programa de Melhoramento Genético da Raça Nelore (PMGRN – Nelore Brasil):

- (a) idade ao primeiro parto (IPP)
- (b) período de gestação (PG)
- (c) peso aos 120 dias (direto e materno) (P120 e MP120, respectivamente)
- (d) peso aos 365 dias (P365)
- (e) peso aos 450 dias (P450)

- (f) perímetro escrotal aos 365 dias (PE365)
- (g) perímetro escrotal aos 450 dias (P450)
- (h) peso adulto (PA)
- (i) probabilidade de permanência no rebanho (STAY)
- (j) produtividade acumulada (PAC)
- (k) área de olho de lombo (AOL)
- (l) espessura de gordura subcutânea entre a 12<sup>a</sup> e a 13<sup>a</sup> costelas (EG)
- (m) espessura de gordura subcutânea medida na garupa (EGP8)
- (n) mérito genético total (MGT)
- (o) probabilidade de prenhez precoce (3P)

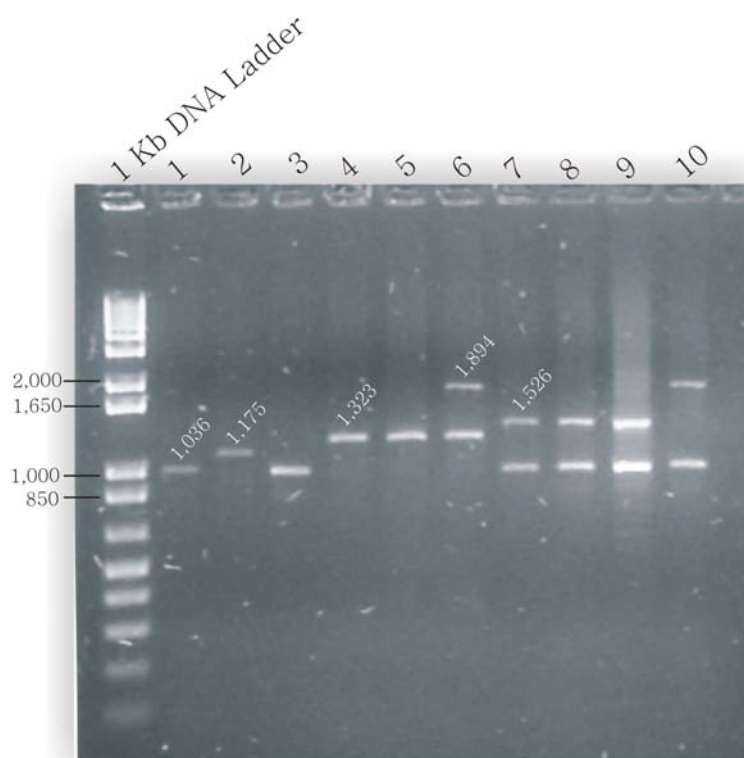
Foi realizada análise de variância para testar existência de associação entre genótipo *MUC1* e os valores de DEPs, utilizando o procedimento GLM do software Statistical Analysis System (SAS, 2003).

## ***IV.RESULTADOS***



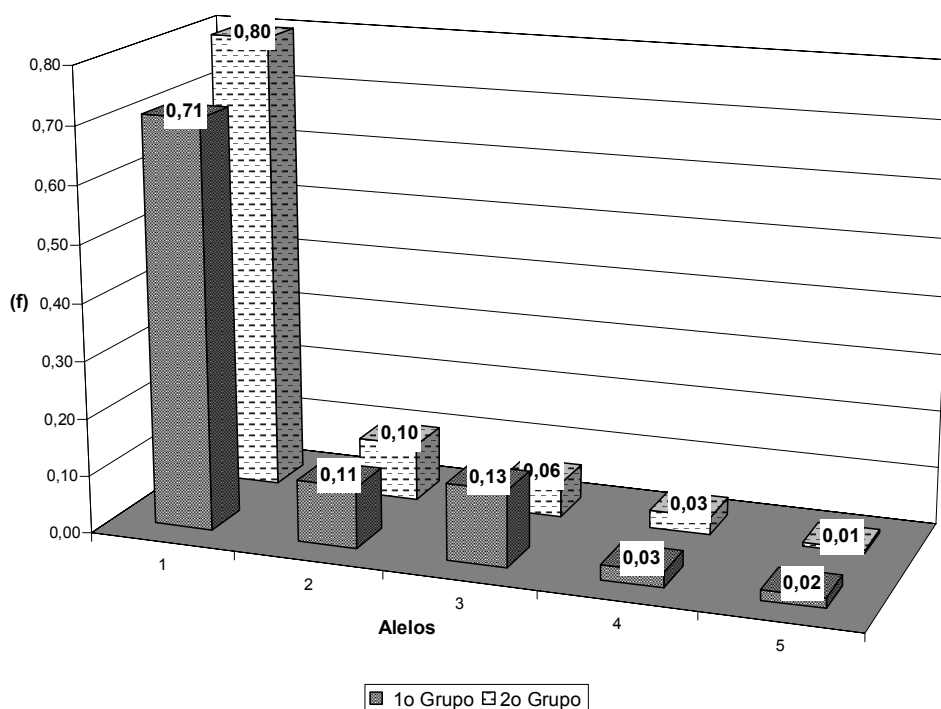
#### *IV.1. Caracterização do polimorfismo genético MUC1 na raça Nelore*

Para o VNTR do gene *MUC1* em bovinos Nelore foram identificados 5 alelos que foram nomeados por números crescentes de 1 a 5, de acordo com seus tamanhos. O alelo 1 apresentou tamanho de 1036 pares de base, os alelos 2, 3, 4, e 5 apresentaram comprimentos de aproximadamente 1175, 1323, 1526 e 1894 pares de base, respectivamente (Figura 2).



**Figura 2.** Gel de agarose 1,5% mostrando os produtos de PCR do gene *MUC1* de 10 amostras de DNA provenientes de novilhas da raça Nelore. Da esquerda para a direita: 1 Kb Plus DNA Ladder, alelo 1, 2, 1, 3, 3, 3/5, 1/4, 1/4, 1/4 e 1/5. Os tamanhos foram estimados pelo algoritmo do programa Kodak Image Analysis.

O alelo 1 foi o mais freqüente, atingindo uma freqüência gênica de 0.71 na amostra do 1º grupo e 0.80 na amostra do 2º grupo . Os alelos 2 e 3 atingiram freqüências de 0.11 e 0.13 na amostra do 1º grupo e, 0.10 e 0.06 na amostra do 2º grupo, respectivamente. Os alelos 4 e 5 foram os alelos de menores freqüências alélicas atingido as freqüências de 0.03 e 0.02 na amostra do 1º grupo e 0.03 e 0.01 na amostra do 2º grupo. Com exceção do alelo 3, que mostrou na amostra do 1º grupo, valor de freqüência acima do dobro do valor obtido na amostra do 2º grupo, todos os outros alelos apresentaram aproximadamente a mesma freqüência em ambos grupos (Figura 3).



**Figura 3.** Freqüências alélicas (f) do gene *MUC1* na amostra estudada.

O genótipo mais freqüente foi o genótipo 1/1 atingindo a freqüência de 0.5 e 0.68 para a amostra do 1º grupo e para a amostra do 2º grupo, respectivamente. Em seguida, os genótipos combinados com o alelo 1. O genótipo 1/2 com freqüência de 0.17 na amostra do 1º grupo, e 0,12 na amostra do 2º grupo, e, o genótipo 1/3, com valores de freqüência

genotípica de 0,17 e 0,07 na amostra do 1º grupo e 2º grupo. Com exceção do genótipo 1/4 com frequência de 0,05 na amostra do 1º grupo, todos demais alelos apresentaram frequência inferior a 0.05 (Tabela 1 e 2).

Para as novilhas do 1º grupo, o valor da heterozigosidade entre alelos do loco *MUC1* foi 0.42. O conteúdo de polimorfismo informativo (PIC), atingiu 0,45 e a diversidade genética foi de 0.75 (Tabela 1).

Para as novilhas do 2º grupo, a heterozigosidade (H) entre os alelos foi de 0.23. O valor do conteúdo de polimorfismo informativo (PIC), foi de 0.33. O valor de diversidade genética foi de 0.54 (Tabela 2).

**Tabela 1.** Frequências alélicas (f), genotípicas (F), valores de heterozigosidade (H), conteúdo de polimorfismo informativo (PIC) e diversidade genética (DG) correspondente ao VNTR do gene *MUC1* em 56 novilhas da raça Nelore do 1º grupo.

Frequências Alélicas (f)		Frequências genotípicas (F)					
f <sub>(1)</sub>	0,71	F <sub>(1/1)</sub>	0,50	F <sub>(2/2)</sub>	0,017	F <sub>(3/4)</sub>	0
f <sub>(2)</sub>	0,11	F <sub>(1/2)</sub>	0,17	F <sub>(2/3)</sub>	0	F <sub>(3/5)</sub>	0,02
f <sub>(3)</sub>	0,13	F <sub>(1/3)</sub>	0,17	F <sub>(2/4)</sub>	0	F <sub>(4/4)</sub>	0,01
f <sub>(4)</sub>	0,03	F <sub>(1/4)</sub>	0,05	F <sub>(2/5)</sub>	0	F <sub>(4/5)</sub>	0
f <sub>(5)</sub>	0,02	F <sub>(1/5)</sub>	0,02	F <sub>(3/3)</sub>	0,035	F <sub>(5/5)</sub>	0
Heterozigosidade (H)		Conteúdo de polimorfismo informativo (PIC)			Diversidade genética (DG)		
0.42		0,45			0,75		

**Tabela 2.** Frequências gênicas (f) e genotípicas (F), heterozigosidade (H), PIC e diversidade genética (DG) correspondente ao VNTR do gene *MUC1* em 253 novilhas da raça Nelore do 2º grupo.

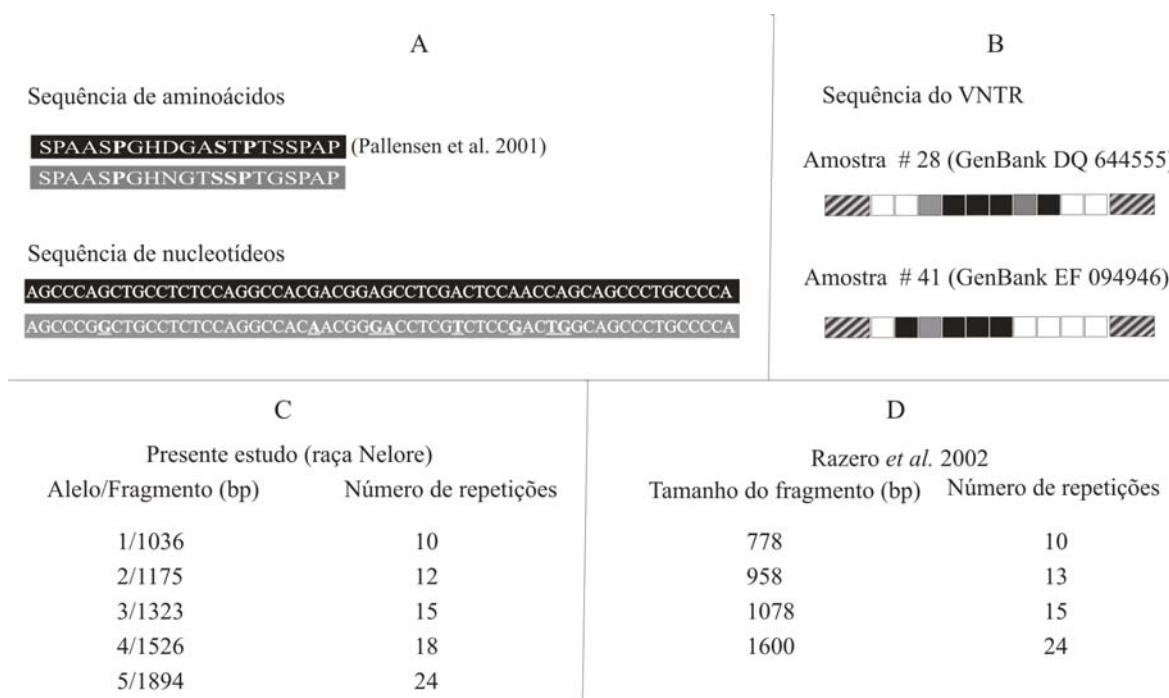
Frequências Alélicas (f)		Frequências genotípicas (F)					
f <sub>(1)</sub>	0,80	F <sub>(1/1)</sub>	0,68	F <sub>(2/2)</sub>	0,04	F <sub>(3/4)</sub>	0
f <sub>(2)</sub>	0,11	F <sub>(1/2)</sub>	0,12	F <sub>(2/3)</sub>	0,01	F <sub>(3/5)</sub>	0
f <sub>(3)</sub>	0,07	F <sub>(1/3)</sub>	0,07	F <sub>(2/4)</sub>	0	F <sub>(4/4)</sub>	0,01
f <sub>(4)</sub>	0,03	F <sub>(1/4)</sub>	0,04	F <sub>(2/5)</sub>	0	F <sub>(4/5)</sub>	0
f <sub>(5)</sub>	0,01	F <sub>(1/5)</sub>	0,01	F <sub>(3/3)</sub>	0,03	F <sub>(5/5)</sub>	0,01
Heterozigosidade (H)		Conteúdo de polimorfismo informativo (PIC)			Diversidade genética (DG)		
0,23		0,33			0,54		

#### IV.2. Seqüenciamento do VNTR do gene *MUC1*

O sequenciamento dos alelos 1 de duas amostras homocigotas correspondentes às amostras #28 e #41 do 1º grupo deu origem às seqüências de 967 (GenBank DQ 644555) e 1011 pares de base (GenBank EF 094946) (Anexo 3 e 4). Em ambas, o Programa Tandem Finder Repeat identificou um VNTR contendo 10 repetições. Na seqüência da amostra #28 foram identificadas 4 repetições que compartilhavam 100% de homologia com a seqüência *consensus* descrita por Pallesen e colaboradores, (2001) e Rasero e colaboradores, (2002). As outras duas seqüências apresentaram homologia parcial com a repetição *consensu*, definida como seqüência imperfeita por Rasero e colaboradores, (2002). Estas últimas apresentaram os códons altamente conservados entre espécies, de um aminoácido serina e dois de prolina (Figura 4 A, B).

A seqüência proveniente da amostra # 41 apresentou duas seqüências *consensus* e 8 repetições imperfeitas. Uma repetição imperfeita apresentou os códons de serina e prolina conservados e as outras 7 apresentaram baixa homologia (Figura 4, B).

Com base nestas seqüências, o número de repetições dos outros alelos foi estimada em 12 repetições para o alelo 2 com comprimento de 1175 pares de base, de 15 repetições para o alelo 3 com comprimento de 1323, de 18 repetições para o alelo 4 com comprimento de 1526, e de 24 repetições para o alelo 5 com o comprimento de 1894 pares de base. Os alelos com 12 repetições e com 18 repetições ainda não haviam sido descritos em bovinos (Figura 4, C, D).



**Figura 4.** VNTR *MUC1* em bovinos da raça Nelore. (A): Em preto, a seqüência de DNA de 60 nucleotídeos com 100% de homologia com a seqüência *consensu* e a predita seqüência de 20 aminoácidos. Em cinza, as seqüências de DNA e aminoácidos da repetição com homologia parcial. Os aminoácidos em negrito ilustram os resíduos de prolina e serina que são conservados entre muitas espécies. Os nucleotídeos sublinhados demonstram as diferenças entre as seqüências. (B) Em preto as seqüências com 100% de homologia em cinza; seqüências com homologia parcial; em branco, as seqüências com baixa homologia, e em listrado as regiões extra-VNTRs. (C) Comprimento em pares de base dos 5 alelos identificados e os respectivos números de repetições (D) Comprimento em pares de base dos 4 alelos já descritos e os respectivos número de repetições de cada um deles.

**IV.3. Análise de associação entre os genótipos do gene *MUC1* e o diagnóstico de gestação em novilhas Nelore**

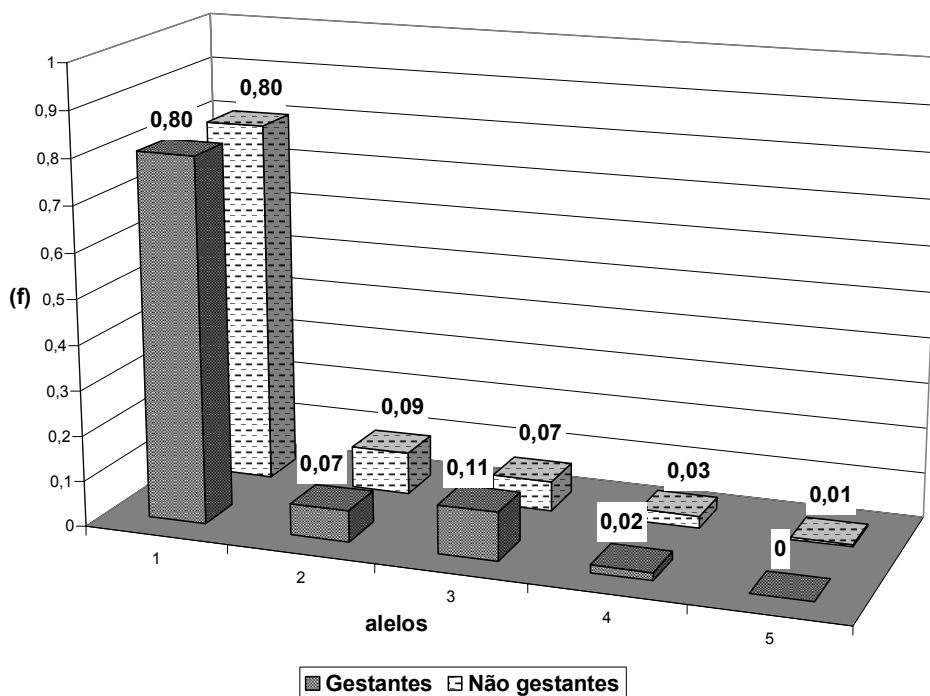
No grupo de novilhas gestantes e não gestantes da amostra do 2º grupo, o alelo 1 foi o mais freqüente atingindo uma freqüência de 0.80. A freqüência alélica do alelo 2, assim como a freqüência alélica do alelo 3, mostrou uma leve diferença entre as amostras de novilhas gestantes e não gestantes. No caso do alelo 2 as freqüências alélicas foram de 0.07 para a amostra de gestantes e 0,09 para a amostra de não gestantes. Para o alelo 3 obtivemos a freqüência alélica de 0,11 para gestantes e de 0,07 para não gestantes. A freqüência do alelo 4 foi de 0,02 para gestantes e 0,03 para não gestantes. Para o alelo 5, as freqüências foram de 0 para gestantes e 0,01 para não gestantes (Tabela 3 e Figura 5).

**Tabela 3.** Freqüências alélicas (f) e genóticas (F) do polimorfismo do gene *MUC1* obtidas das novilhas gestantes e não gestantes da amostra do 2º grupo (N=232).

Novilhas Nelore gestantes (N=76)							
Freqüências Alélicas (f)				Freqüências genóticas (F)			
f <sub>(1)</sub>	0,80	F <sub>(1/1)</sub>	0,70	F <sub>(2/2)</sub>	0,04	F <sub>(3/4)</sub>	0
f <sub>(2)</sub>	0,07	F <sub>(1/2)</sub>	0,05	F <sub>(2/3)</sub>	0,01	F <sub>(3/5)</sub>	0
f <sub>(3)</sub>	0,11	F <sub>(1/3)</sub>	0,10	F <sub>(2/4)</sub>	0	F <sub>(4/4)</sub>	0
f <sub>(4)</sub>	0,02	F <sub>(1/4)</sub>	0,04	F <sub>(2/5)</sub>	0	F <sub>(4/5)</sub>	0
f <sub>(5)</sub>	0	F <sub>(1/5)</sub>	0	F <sub>(3/3)</sub>	0,05	F <sub>(5/5)</sub>	0

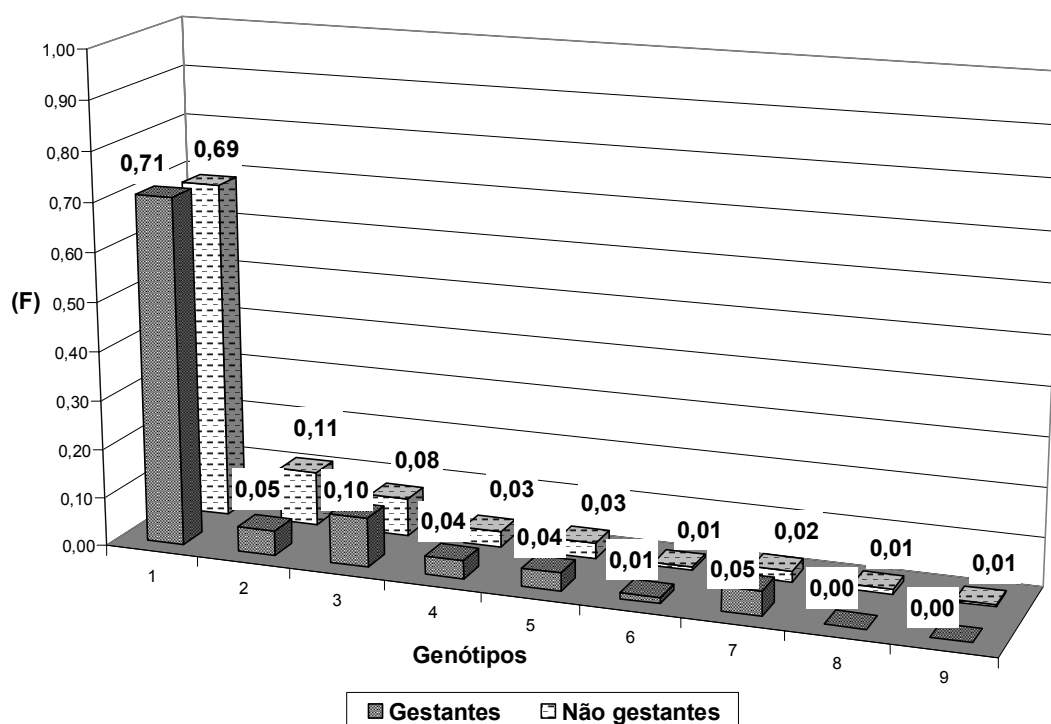
Novilhas Nelore não gestantes (N=156)							
Freqüências Alélicas (f)				Freqüências genóticas (F)			
f <sub>(1)</sub>	0,80	F <sub>(1/1)</sub>	0,70	F <sub>(2/2)</sub>	0,03	F <sub>(3/4)</sub>	0
f <sub>(2)</sub>	0,09	F <sub>(1/2)</sub>	0,11	F <sub>(2/3)</sub>	0,01	F <sub>(3/5)</sub>	0
f <sub>(3)</sub>	0,07	F <sub>(1/3)</sub>	0,08	F <sub>(2/4)</sub>	0	F <sub>(4/4)</sub>	0,01
f <sub>(4)</sub>	0,03	F <sub>(1/4)</sub>	0,03	F <sub>(2/5)</sub>	0	F <sub>(4/5)</sub>	0
f <sub>(5)</sub>	0,01	F <sub>(1/5)</sub>	0	F <sub>(3/3)</sub>	0,02	F <sub>(5/5)</sub>	0,01



**Figura 5.** Frequências alélicas (f) dos alelos do gene *MUC1* em novilhas gestantes e não gestantes do 2º grupo.

O genótipo mais freqüente tanto na amostra de gestantes como de não gestantes foi o genótipo (1/1) com 0,70. O genótipo (1/2) apresentou uma freqüência de 0,05 em gestantes e 0,11 em não gestantes. O genótipo (1/3) apresentou freqüência genotípica de 0,10 para gestantes e 0,08 para não gestantes. O genótipo (3/3) em gestantes foi quarto genótipo mais freqüente na amostra com uma freqüência de 0,05 e. Os demais genótipos apresentaram freqüência inferior à 0,05 ( Tabela 3 e Figura 6).





**Figura 6.** Frequências genotípicas (F) do gene *MUC1* em gestantes e não gestantes.

Para a análise estatística, foram construídas duas tabelas de contingências (Tabela 4 e Tabela 5) com frequências gênicas e genotípicas, respectivamente. Para comparar os valores observados com os esperados foi utilizado o teste do  $\chi^2$ , com uso do software Microsoft Excel (Excel, 2003).

**Tabela 4.** Tabela de contingência para frequência genotípica.

Genótipos	Diagnóstico de gestação		Total
	Gestante (O x E)	Não Gestante (O x E)	
11	55 (53,06)	107 (108,93)	162
12	4 (6,87)	17 (14,12)	21
13	8 (6,55)	12 (13,44)	20
14	3 (2,62)	5 (5,37)	8
22	2 (2,62)	6 (5,37)	8
23	1 (0,65)	1 (1,34)	2
33	3 (2,62)	5 (5,37)	8
44	0 (0,65)	2 (1,34)	2
55	0 (0,32)	1 (0,67)	1
<b>Total</b>	<b>76</b>	<b>156</b>	<b>232</b>

**Tabela 5.** Tabela de contingência para frequência gênica.

Número de Alelos	Diagnóstico de gestação				Total
	Gestantes (O x E)		Não Gestantes (O x E)		
1	125	(122,18)	248	(250,81)	373
2	9	(12,77)	30	(26,22)	39
3	15	(12,44)	23	(25,55)	38
4	3	(3,93)	9	(8,06)	12
5	0	(0,65)	2	(1,34)	2
Total	152		312		464

O teste do qui-quadrado demonstrou que não houve diferença significativa ( $\chi^2=0,81$ ;  $P=0,99$ ; graus de liberdade= 8;  $\chi^2$  crítico = 15,50) entre a frequência genotípica do gene *MUC1* e o número de novilhas gestantes e não gestantes da amostra 2.

O teste do qui-quadrado também demonstrou que não houve diferença significativa ( $\chi^2=0,43$ ;  $P=0,98$ ; graus de liberdade = 4;  $\chi^2$  crítico = 9,48) entre a frequência dos alelos do gene *MUC1* e o número de novilhas gestantes e não gestantes da amostra 2.

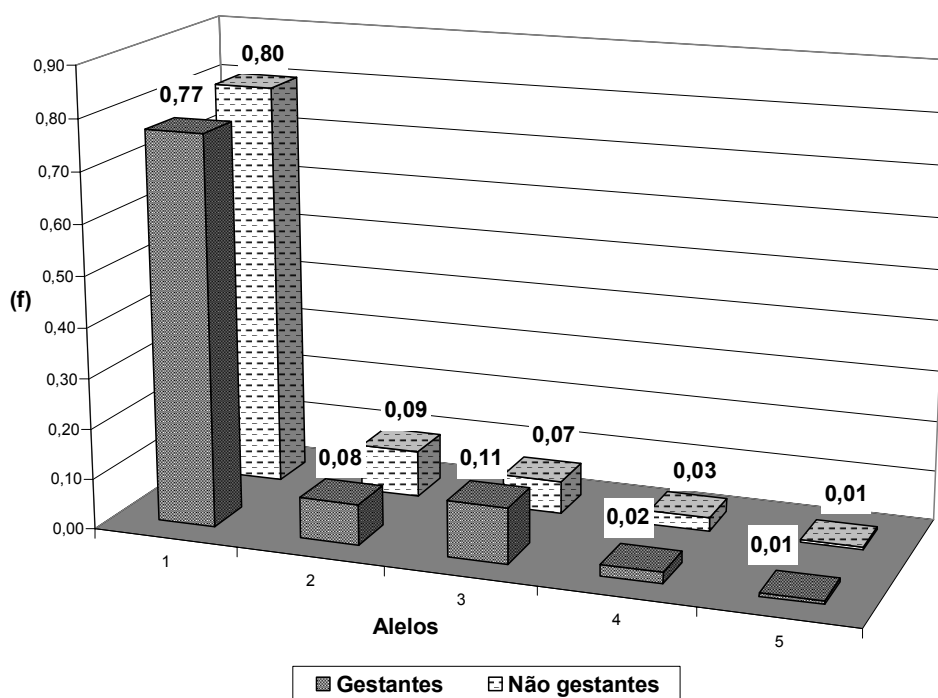
As frequências gênicas obtidas do número total de novilhas gestantes (1º e 2º grupo) e as frequências gênicas da amostra de não gestantes obtida da amostra do 2º grupo foram aproximadamente similares para todos alelos (Tabela 6 e Figura 7).

**Tabela 6.** Frequências alélicas (f) e genotípicas (F) do gene *MUC1* nas amostras de 132 novilhas gestantes do 1º e 2º grupo, e nas amostras de 156 novilhas não gestantes do 2º grupo.

Novilhas Nelore gestantes (N=132)							
Frequências Alélicas (f)				Frequências genotípicas (F)			
f <sub>(1)</sub>	0,77	F <sub>(1/1)</sub>	0,62	F <sub>(2/2)</sub>	0,02	F <sub>(3/4)</sub>	0
f <sub>(2)</sub>	0,08	F <sub>(1/2)</sub>	0,10	F <sub>(2/3)</sub>	0,01	F <sub>(3/5)</sub>	0,01
f <sub>(3)</sub>	0,11	F <sub>(1/3)</sub>	0,13	F <sub>(2/4)</sub>	0	F <sub>(4/4)</sub>	0
f <sub>(4)</sub>	0,02	F <sub>(1/4)</sub>	0,05	F <sub>(2/5)</sub>	0	F <sub>(4/5)</sub>	0
f <sub>(5)</sub>	0,01	F <sub>(1/5)</sub>	0,01	F <sub>(3/3)</sub>	0,04	F <sub>(5/5)</sub>	0

Novilhas Nelore não gestantes (N= 156)							
Frequências Alélicas (f)				Frequências genotípicas (F)			
f <sub>(1)</sub>	0,802	F <sub>(1/1)</sub>	0,70	F <sub>(2/2)</sub>	0,03	F <sub>(3/4)</sub>	0
f <sub>(2)</sub>	0,092	F <sub>(1/2)</sub>	0,11	F <sub>(2/3)</sub>	0,01	F <sub>(3/5)</sub>	0
f <sub>(3)</sub>	0,065	F <sub>(1/3)</sub>	0,08	F <sub>(2/4)</sub>	0	F <sub>(4/4)</sub>	0,01
f <sub>(4)</sub>	0,027	F <sub>(1/4)</sub>	0,03	F <sub>(2/5)</sub>	0	F <sub>(4/5)</sub>	0
f <sub>(5)</sub>	0,005	F <sub>(1/5)</sub>	0	F <sub>(3/3)</sub>	0,02	F <sub>(5/5)</sub>	0,01



**Figura 7.** Frequências alélicas (f) do gene *MUC1* das amostras de novilhas gestantes do 1º e 2º grupo e das amostras de novilhas não gestantes do 2º grupo.

#### ***IV.4. Análise de variância (ANOVA) do polimorfismo MUC1 e as diferenças esperadas na progênie (DEPs)***

Para a análise de variância do polimorfismo do gene *MUC1* e as diferenças esperadas na progênie (DEPs) foram utilizadas informações de 279 novilhas do 1º e do 2º grupos da amostra.

Entre 187 novilhas analisadas, observamos que os animais com genótipo 1/1 apresentaram os maiores valores para DEPs de peso aos 120 dias (P120), peso aos 365 dias (P365), peso aos 450 dias (P450) e peso adulto (PA). O valor médio das DEPs de probabilidade de prenhez precoce (3P) e probabilidade de permanência no rebanho também foram mais altos neste grupo de animais. Comparando os dados obtidos de 29 novilhas, o genótipo 1/2 apresentou maiores valores para as mesmas características, quando comparado ao genótipo 1/3. O valor médio das DEPs para idade ao primeiro parto (IPP) foi menor nos animais com o genótipo 1/1 e 1/2 quando comparados ao genótipo 1/3, indicando que os genótipos com menor número de repetições podem estar associados à prenhez precoce. Os valores médios de DEP em cada genótipo analisado estão sumarizados na tabela 7.

A análise revelou que não existe relação entre os diferentes genótipos *MUC1* com os valores das DEPs das características analisadas ( $p > 0,05$ ) (Tabela 8). As características peso aos 120 dias (P120) e MGT foram as características mais próximas de um valor significativo, com valores de  $p = 0,08$  e  $p = 0,14$ , respectivamente.

**Tabela 7.** Médias das DEPs e desvios padrões para cada tipo de genótipo do gene *MUC1* em 279 novilhas da raça Nelore.

DEP	Genótipos <i>MUC1</i> (Média da DEP ± Desvio padrão)							
	1/1 (N=187)		1/2 (N=29)		1/3 (N=28)		1/4 (N=11)	
P120	3.68	±1.64	3.30	±1.85	3.16	±2.43	3.42	±2.04
MP120	0.90	±1.25	1.24	±0.77	1.06	±1.13	0.87	±1.03
P365	9.62	±4.07	9.49	±3.85	8.93	±5.07	8.20	±5.94
P450	10.0	±4.97	9.71	±4.62	9.40	±6.07	8.85	±7.80
MGT	1.07	±0.41	1.06	±0.40	0.96	±0.52	0.92	±0.54
IPP	-0.56	±0.49	-0.46	±0.37	-0.38	±0.39	-0.39	±0.53
PA	18.2	±7.65	17.0	±6.85	15.87	±7.05	14.26	±5.25
PG	0.26	±1.03	-0.13	±0.76	0.31	±1.12	0.32	±0.81
3P	54.09	±5.57	52.0	±4.20	51.31	±4.87	51.25	±5.16
STAY	47.00	±18.13	40.3	±23.2	37.99	±24.51	40.20	±25.9
AOL	0.49	±0.54	0.38	±0.55	0.44	±0.54	0.50	±0.38
EG	0.01	±0.14	0.01	±0.12	0.00	±0.09	0.00	±0.15
EGP8	0.00	±0.14	0.00	±0.19	0.00	±0.09	0.02	±0.11

**Tabela 7.** (continuação)

DEP	Genótipos <i>MUC1</i> (Média da DEP $\pm$ Desvio padrão)			
	1/5 (N=1)	2/2 (N=7)	2/3 (N=2)	3/3 (N=10)
P120	-2.81	3.64 $\pm$ 1.48	4.97 $\pm$ 0.28	2.63 $\pm$ 1.65
MP120	0.26	0.13 $\pm$ 0.40	0.75 $\pm$ 0.63	0.89 $\pm$ 1.25
P365	-2.04	9.18 $\pm$ 3.22	12.04 $\pm$ 4.93	7.67 $\pm$ 3.72
P450	-2.60	9.63 $\pm$ 4.45	12.57 $\pm$ 9.12	7.64 $\pm$ 3.70
MGT	-0.21	1.00 $\pm$ 0.33	1.47 $\pm$ 0.43	0.86 $\pm$ 0.40
IPP	-0.30	-0.60 $\pm$ 0.60	-0.17 $\pm$ 0.07	-0.60 $\pm$ 0.54
PA	15.20	17.60 $\pm$ 10.80	20.18 $\pm$ 3.93	14.40 $\pm$ 9.47
PG	0.380	-0.00 $\pm$ 0.87	-0.01 $\pm$ 0.71	-0.00 $\pm$ 1.20
3P	50.05	54.35 $\pm$ 5.32	50.60 $\pm$ 0.70	52.83 $\pm$ 5.41
STAY	0	52.86 $\pm$ 1.45	52.97 $\pm$ 0.24	43.00 $\pm$ 22.77
AOL	0.33	0.54 $\pm$ 0.53	-0.10 $\pm$ 0.16	0.29 $\pm$ 0.58
EG	0.15	9.91 $\pm$ 0.05	0.020 $\pm$ 0.07	-0.02 $\pm$ 0.09
EGP8	0.31	0.05 $\pm$ 0.11	0.035 $\pm$ 0.20	-0.07 $\pm$ 0.06

Tabela 7. (continuação)

DEP	Genótipos <i>MUC1</i> (Média da DEP $\pm$ Desvio padrão)		
	3/5 (N=1)	4/4 (N=2)	5/5 (N=1)
P120	-0,43	5,45 $\pm$ 0,38	2,90
MP120	2,57	1,11 $\pm$ 0,30	-1,87
P365	4,30	14,98 $\pm$ 0,24	5,12
P450	0,92	15,97 $\pm$ 1,14	3,87
MGT	0,50	1,62 $\pm$ 0,16	0,56
IPP	-0,32	-0,59 $\pm$ 0,50	-1,33
PA	16,05	28,42 $\pm$ 0,65	17,00
PG	0,48	0,18 $\pm$ 0,48	-0,77
3P	53,75	52,80 $\pm$ 5,79	63,00
STAY	0	56,27 $\pm$ 5,19	55,85
AOL	0,37	0,46 $\pm$ 0,20	1,04
EG	0,02	0,01 $\pm$ 0,04	-0,06
EGP8	0,13	-0,06 $\pm$ 0,01	-0,11

**Tabela 8.** Valores de  $p$  obtidos da análise de variância do gene *MUC1* com os valores das diferenças esperadas na progênie de 279 novilhas do 1º e do 2º grupo.

DEP	Valor de F	p(0,05)
P120	1,69	0,08
MP120	1,20	0,29
P365	1,20	0,29
P450	1,07	0,38
MGT	1,47	0,14
PE365	1,09	0,37
PE450	0,62	0,79
IPP	0,70	0,72
PA	1,13	0,34
PAC	0,91	0,52
PG	0,66	0,76
STAY	1,32	0,21
3P	1,16	0,31
AOL	0,58	0,82
EG	0,21	0,99
EGP8	0,99	0,45

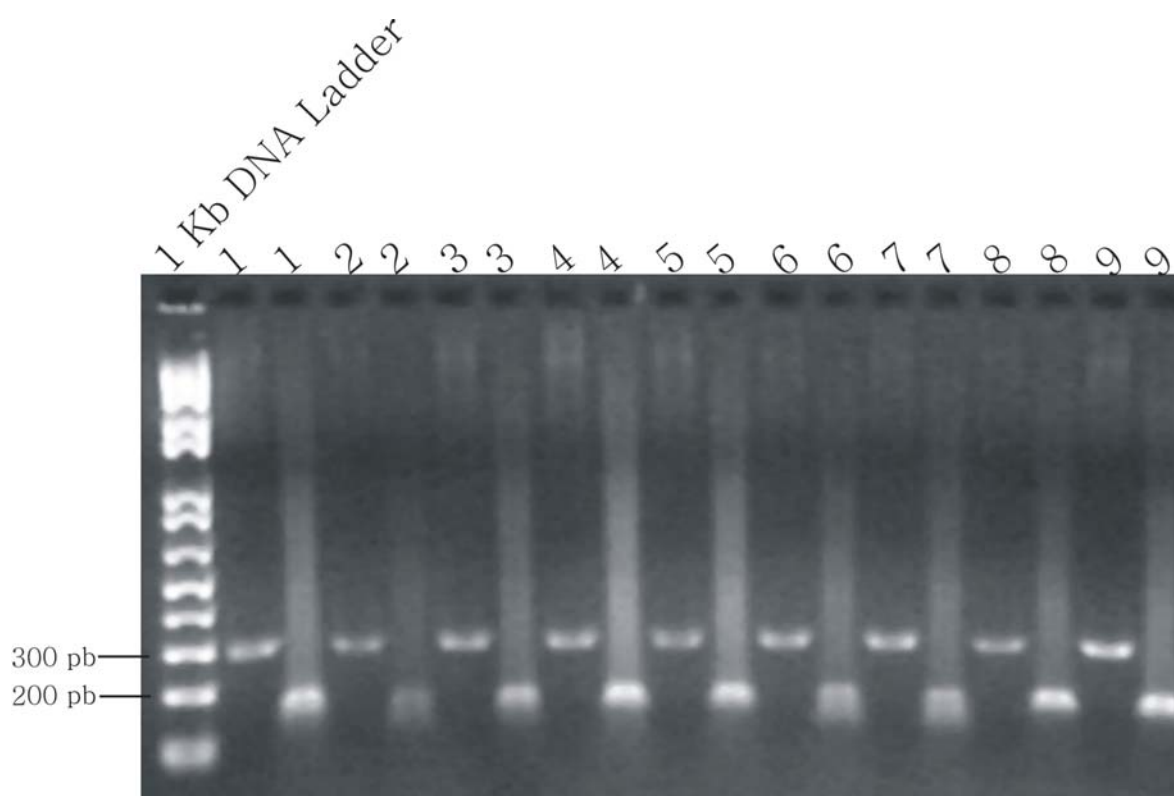


#### ***IV.5. Polimorfismo SNP no íntron 4 do gene *SPP1****

Para a análise do polimorfismo de nucleotídeo simples (T/C) no íntron 4 do gene *SPP1* da glicoproteína osteopontina foi utilizada uma amostra com 38 novilhas Nelore gestantes e 24 novilhas não gestantes, provenientes do 2º grupo.

A amplificação do gene *SPP1* originou um fragmento com comprimento estimado em 290 pares de base em todas as 62 amostras. A reação com enzima de restrição *Dde I* revelou um fragmento com comprimento equivalente à 200 pares de base, que demonstrou a presença de um sítio de restrição correspondente ao alelo T da osteopontina bovina (Figura 8).

Todas as 38 amostras estudadas do grupo gestante, assim como as 24 do grupo não gestante, exibiram o sítio de restrição para a enzima *Dde I* demonstrando que todas as amostras apresentavam o genótipo T/T do polimorfismo de nucleotídeo simples no íntron 4 do gene da osteopontina (Figura 8).



**Figura 8.** Região amplificada do gene *SPPI* correspondente ao íntron 4 de 9 amostras de novilhas gestantes do 2º grupo. Na 1ª coluna à esquerda, o marcador 1 Kb Plus DNA Ladder. Nas colunas de 1 a 9: à esquerda, os fragmentos amplificados do gene da osteopontina com 290 pares de base e à direita, os produtos da reação de restrição com a enzima *Dde I* com 200 pares de base.

# ***V.DISSCUSSÃO***

Genes de mucinas são caracterizados pela presença incomum de repetições intragênicas no transcrito. A maioria dos genes que apresentam número variável de repetições em tandem em sua região codificante é caracterizada por proteínas de superfície celular, envolvidas em interações célula-célula. As alterações quantitativas na superfície celular manifestam-se como diferentes níveis de adesão e floculação nas células. Esta ampla variedade de eficiência funcional surge da variação no comprimento do VNTR, causada por desalinhamento das repetições durante o “crossing over” na meiose (VERSTREPEN et al., 2005).

Em várias espécies, o gene da mucina MUC1 é formado por um VNTR com uma seqüência repetitiva de 60 aminoácidos, que se repetem variando de 75 a 100% em homologia com uma seqüência consensu (SACCHI et al., 2004). Em nosso estudo, utilizando novilhas da raça Nelore, o sequenciamento de duas amostras homozigotas para alelo 1 (GenBank DQ 644555 e GenBank EF 094946) revelaram que o VNTR do gene *MUC1* também apresenta a região repetitiva formada por uma seqüência *consensu* de 60 nucleotídeos, que se repetem variando em homologia. Esta seqüência repetitiva *consensu* possui a mesma seqüência relatada em caprinos e em outras raças de bovinos e, tem como característica, a presença dos aminoácidos de prolina, treonina e serina conservados.

Até o presente momento haviam sido relatadas duas seqüências da repetição que forma o VNTR *MUC1* bovino (SPICER et al., 1995; PALLESEN et al., 2001). No presente trabalho, identificamos a seqüência de uma terceira repetição, que se repete por duas vezes na amostra de DNA #28 e uma vez na amostra #41. Esses resultados demonstraram a instabilidade do VNTR *MUC1* em bovino, com variações tanto no número de repetições, como na seqüência de uma repetição para outra. A característica de variação intra-VNTR do VNTR *MUC1* bovino foi denominada por Rasero e colaboradores (2002) de repetição imperfeita. Apesar desta variação, o VNTR tende a manter conservados os códons que traduzem para os aminoácidos

de prolina , serina e treonina. Esse evento provavelmente ocorre devido à importância destes resíduos na função da molécula. Os aminoácidos de prolina fornecem uma estrutura extensa, enquanto que os aminoácidos de serina e treonina servem como sítios para a O-glicosilação da molécula (PATTON et al., 1995).

Até o momento, 4 alelos para o gene *MUC1* haviam sido descritos em bovinos. O número de repetições do primeiro alelo, com 778 pares de base, foi estimado em 10 repetições e o segundo, com 958 pares de base, foi estimado em 13 repetições. O terceiro e quarto alelos com 1078 e 1600 pares de base, foram estimados em 15 e 24 repetições, respectivamente (RASERO et al., 2002). No presente estudo, descrevemos 5 alelos com tamanhos de 1036, 1175, 1323, 1526 e 1894 pares de base. O seqüenciamento de uma amostra um animal homocigoto para o alelo 1 revelou alelos com 10, 12, 15, 18 e 24 repetições. Os alelos com 12 e 18 repetições ainda não haviam sido descritos na espécie bovina e foram publicados recentemente por nosso grupo (SOUZA et al., 2007).

Em nossa amostra, o tamanho dos produtos de PCR dos alelos descritos com 10, 15 e 24 repetições não foram concordantes com os dados da literatura.. Os fragmentos com 10, 15 e 24 repetições identificados por Rasero e colaboradores (2002) apresentavam 778, 1078 e 1600 pares de base. No presente estudo, os alelos com 10, 15 e 24 repetições formaram fragmentos equivalentes à 1036, 1323 e 1894 pares de base, provavelmente devido a diferenças na região extra-VNTR.

Em nossos resultados, a alta freqüência do alelo 1, que apresenta menor número de repetições, foi contrária aos dados publicados por Sacchi e colaboradores, (1995), que relataram uma maior freqüência de alelos com tamanho intermediário.

A heterozigosidade do alelo *MUC1* que atinge o valor de 0,80 em caprinos, em bovinos Nelore, varia de 0,23 à 0,42. O conteúdo de polimorfismo informativo (PIC) também foi abaixo de 0,50, indicando que o *MUC1* é um marcador pouco informativo para

a análise em genética populacional.

Em bovinos, os alelos *MUC1* foram fortemente associados à variação nos glóbulos de gordura do leite, chegando a atingir a concentração de 40mg/ml de leite. A molécula também já foi associada às características ligadas à produção, saúde e reprodução. (RASERO et al., 2002; HENS et al., 1995).

Em humanos, a associação entre o polimorfismo do gene *MUC1* e condições patológicas específicas têm sido frequentemente estudada. Análises de amostras de populações com carcinoma gástrico e metaplasia intestinal incompleta revelaram que as mesmas tendem a apresentar alelos de menor tamanho, quando comparadas às amostras com metaplasia intestinal completa (CARVALHO et al., 1997; SILVA et al., 2001). Os alelos de maior tamanho também foram associados à acne severa e a um pior prognóstico para adenocarcinoma de pulmão. (ANDO et al., 1998; MITSUTA et al., 2005).

Em relação à fertilidade, o papel do polimorfismo do gene *MUC1* ainda encontra-se controverso. A principal hipótese é que a estrutura extensa proporcionada pelo VNTR funcionaria como uma barreira anti-adesiva para o processo de implantação embrionária (SHARKEY et al., 2003).

No trato reprodutivo de ratos, porcos e ruminantes, a glicoproteína MUC1 é reprimida pela progesterona durante o período de implantação embrionária. Nesta mesma fase em humanos e coelhos, a progesterona estimula a expressão da mucina uterina. Entretanto, observou-se que nestes casos existe uma inibição da molécula no sítio de implantação sugerindo a existência de um controle de expressão realizada pelo blastocisto. Por outro lado, a glicosilação histo-específica do VNTR da mucina MUC1 com estruturas de sialyl-Lewis e heparan sulfato podem fornecer propriedades adesivas para moléculas expressas normalmente na superfície do blastocisto, como L-selectinas (GENBACEV et al., 2003). Todos estes estudos sugerem que variações na região do VNTR podem

influenciar a interação do blastocisto com o epitélio luminal uterino (APLIN et al., 2001).

Em 2001, Horne e colaboradores relataram uma alta frequência dos alelos de menor tamanho em uma amostra de 10 mulheres com infertilidade de causa desconhecida. Por outro lado Goulart e colaboradores, (2004), em estudo semelhante, não encontraram associação significativa entre o polimorfismo e a infertilidade.

Casos de infertilidade em bovinos são raros. Grande parte da infertilidade é causada por doenças infecciosas e fatores ambientais como climáticos e nutricionais. Porém, a falha de implantação embrionária em vacas com ovulação sincronizada é um evento frequente (GALIMBERT et al., 2001). No presente estudo, as frequências alélicas e genótípicas do *MUC1* foram semelhantes nos dois grupos, com e sem gestação.

Em relação à associação entre os genótipos e as DEPs, observamos que as DEPs para peso aos 120 dias, peso aos 365 dias, peso aos 450 dias e peso adulto foram maiores em animais com os genótipos 1/1. Também foi possível observar que estes valores foram maiores no genótipo 1/2, quando comparados ao genótipo 1/3. Contudo não foi possível estabelecer a correlação entre o polimorfismo e as diferenças esperadas na progênie (DEPs), devido a predominância do genótipo 1/1 e à baixa frequência de genótipos com menor número de repetições.

Não podemos, no entanto, descartar a hipótese de que o efeito da mucina MUC1 pode ter sido mascarado indiretamente pela seleção reprodutiva, aplicada pelo Programa de Melhoramento Genético da Raça Nelore. A alta frequência de um dos 5 alelos e a baixa heterozigosidade encontrada em nossa amostra podem estar refletindo o diferencial deste alelo para a população.

A osteopontina é uma glicoproteína que está presente no leite, plasma e urina. No leite humano, sua concentração chega a atingir 10µg/ml e no leite cru de vacas, sua concentração atinge 8mg/L (LEONARD et al., 2005). A molécula participa de processos fisiológicos como

adesão celular, comunicação entre a célula e matriz extracelular, mineralização tecidual e deposição de fosfato de cálcio no osso, dentre outras (JONHSON et al., 2003).

Em humanos, seus polimorfismos já foram associados à predisposição a cálculos renais, à artrite oligoarticular idiopática juvenil, e à melhor resposta à terapia com interferon para pacientes com hepatite crônica tipo C (GAO et al., 2005; MARCIANO et al., 2006; NAITO et al., 2005).

Em bovinos, foi identificado um QTL afetando as características de produção de leite no cromossomo 6, próximo ao gene da osteopontina, *SPPI*. Tal associação direcionou atenção especial para o gene (ZHANG et al., 1998).

Foram identificados até o momento 2 polimorfismos de nucleotídeo simples na osteopontina. O primeiro polimorfismo, caracterizado por SNP T(9)/T(10), foi associado à produção e composição do leite, ao parto gemelar, e à características relacionadas ao crescimento, como peso ao nascimento, peso à desmama e peso aos 365 dias (WHITE et al., 2007; ALLAN et al., 2006; SCHANABEL et al., 2005). O segundo polimorfismo SNP (T/C), mostrou que o alelo C está associado ao aumento na porcentagem de proteína e gordura do leite (LEONARD et al., 2005).

Em nosso estudo, após análise de amostras de DNA obtido de novilhas da raça Nelore, não detectamos o polimorfismo C no íntron 4 do gene *SPPI*, como descrito na raça Holandesa por Leonard e colaboradores (2005). Sugerimos que a ausência deste polimorfismo possa constituir uma característica específica em *Bos taurus indicus*. Porém, dada a associação já descrita entre polimorfismo do gene *SPPI* e características de crescimento, não descartamos a hipótese de que, assim como o *MUC1*, tenha ocorrido uma seleção indireta devido aos critérios aplicados pelo Programa de Melhoramento Genético da Raça Nelore.



## ***VI. CONCLUSÕES***

- (1) O polimorfismo do gene *MUC1* em bovinos da raça Nelore foi caracterizado por 5 alelos: alelo 1 com 1036 pares de base; alelo 2, com 1175 pares de base; alelo 3 com 1323 pares de base; alelo 4 com 1526 pares de base e alelo 5 com 1894 pares de base.
- (2) O alelo 1 do gene *MUC1* apresentou 10 repetições, o alelo 2 apresentou 12 repetições, o alelo 3, 15 repetições, o alelo 4 apresentou 18 repetições e o alelo 5 apresentou 24 repetições. Os alelos com 12 e 18 repetições ainda não haviam sido descritos na literatura.
- (3) Em bovinos da raça Nelore identificamos uma terceira sequência *consensu* do gene *MUC1*.
- (4) Os resultados obtidos não permitiram estabelecer associação entre o polimorfismo do gene *MUC1* e o diagnóstico de gestação em novilhas da raça Nelore, assim como o polimorfismo do gene *MUC1* e valores de diferença esperada na progênie (DEP).
- (5) Em novilhas da raça Nelore, não foi identificado o alelo C do polimorfismo de nucleotídeo simples (SNP) no íntron 4 do gene *SPPI*, como foi descrito na raça Holstein.

## ***VII.REFERÊNCIAS***

ALLAN, M.F., THALMAN, R.M., CUSHMAN, R.A., ECHTERNKAMP, S.E., WHITE, S.N., KUEHN, L.A., CASAS, E., SMITH, T.P. Association of a single nucleotide polymorphism in SSP1 with growth traits and twinning in a cattle population selected for twinning rate. *Journal of Animal Science*, v. 85, p.341-347, 2006.

ANDERSSON, L. Genetic dissection of phenotypic diversity in farm animals. *Nature Reviews Genetics*, v.2, p.130-138, 2001.

ANDO, I., KUKITA, A., SOMA, G., HINO, H. A large number of tandem repeats in the polymorphic epithelial mucin gene is associated with severe acne. *Journal of Dermatology*, v.25, p.150-152, 1998.

APLIN, J.D., HEY, N.A., GRAHAM, R.A. Human endometrial MUC1 carries keratan sulfate: characteristic glycoforms in luminal epithelium at receptivity. *Glycobiology*, v.8, p.269-276, 1998.

APLIN, J.D., MESEGUER, M., SIMÓN, C., ORTÍZ, M.E., CROXATTO, H., JONES, C.J.P. MUC1, glycans and the cell-surface barrier to embryo implantation. *Biochemical Society Transactions*, v.29, p.153-156, 2001.

BELLINGE, R.H., LIBERLES, D.A., IASCHI, S.P., OBRIEN, P.A., TAY, G.K. Myostatin and its implication on animal breeding: a review. *Animal Genetics*, v.36, p.1-6, 2005.

BENSON, G. Tandem repeats finder: a program to analyse DNA sequences. *Nucleic Acids Research*, 27, 573–580, 1999

BORTHWICK, J.M., CHARNOCK-JONES, D.S., TOM, B.D., HULL, M.L., TEIRNEY, R., PHILLIPS, S.C., SMITH, S.K. Determination of the transcript profile of human endometrium. *Molecular Human Reproduction*, v.9, p.19-33, 2003.

BOWEN, J.A., BAZER, F.W., BURGHARDT R.C. Spatial and temporal analyses of integrin and Muc-1 expression in porcine uterine epithelium and trophoctoderm in vivo. *Biology of Reproduction*, v.55, p.1098-1106, 1996.

BOWEN, J.A., BURGHARDT, R.C. Cellular mechanisms of implantation in domestic farm animals. *Cell & Developmental Biology*, v.11, p.93-104, 2000.

BRAGA, V.M.M., GENDLER, S.J. Modulation of Mucl mucin expression in the mouse uterus during the estrus cycle, early pregnancy and placentation. *Journal of Cell Science*, v.105, p.397-405, 1993.

BRAYMAN, M., THATHIAH, A., CARSON, D.D. MUC1 A multifunctional cell surface component of reproductive tissue epithelia. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.2, p.4, 2004.

BROWN, L.F., BERSE, B., VAN DE WATER, L., PAPADOPOULOS-SERGIU, A., PERUZZI, C.A., MANSEAU, E.J., DVORAK, H.F., SENGER, D.R. Expression and distribution of osteopontin in human tissues: widespread association with luminal epithelial surfaces. **Molecular Biology of the Cell**, v.3, p.1169-1180, 1992.

BUTLER, W.T., RIDALL, A.L., MCKEE, M.D. Osteopontin. In: *Principals of Bone biology*. New York: Academic Press. p.167-181, 1996.

CARSON, D.D., DE SOUZA, M.M., KARDON, R., ZHOU, X., LAGOW, E., JULIAN, J. Mucin expression and function in the female reproductive tract. **Human Reproduction Update**, v.5, p.459-464, 1998.

CARVALHO F., SERUCA R., DAVID L., AMORIM A., SEIXAS M., BENNETT E., CLAUSEN H., SOBRINHO-SIMÕES M. *MUC1* gene polymorphism and gastric cancer – an epidemiological study. *Glycoconjugates. Journal*, v.14, p. 107–111, 1997.

CRAIG, A.M., DENHARDT, D.T. The murine gene encoding secreted phosphoprotein 1 (osteopontin): promoter structure, activity and induction in vivo by estrogen and progesterone. **Gene**, v.100, p.163-171, 1991.

DEKKER, J., ROSSEN, J.W.A., BULLER, H.A., EINERHAND, A.W.C. The MUC1 family: an obituary. **Trends in Biochemical Sciences**, v.27, p.126-131, 2002.

DE SOUZA, M.M. SURVEYOR, G.A., PRICE, R.E., JULIAN, J., KARDON, R., ZHOU, X., GENDLER, S., HILKENS, J., CARSON, D.D. MUC1/epsialin: a critical barrier in the female reproductive tract. **Journal of Reproductive Immunology**, v.45, p.1127-158, 1999.

DURASAMY, S., RAMASAMY, S., KHARBANDA, S., KUFU, D. Distinct evolution of the human carcinoma-associated transmembrane mucins, MUC1, MUC4, and MUC16. **Gene**, v.373, p.28-34, 2006.

FRANZEN, A., HEINEGARD, D. Isolation and characterization of two sialoproteins present only in bone calcified matrix. **Biochemical Journal**, v.232, p.715-724, 1985.

GALIMBERT, A.M., FONSECA, F.A., ARAÚJO, M.C.C., COSTA, E.P., FREITAS C., GUIMARÃES, J.D., FERREIRA, A.M. Taxa de gestação e níveis plasmáticos de progesterona em receptoras de embrião bovino, tratadas com busarelina após inovulação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, p.353-359, 2001.

GAO, B., YASUI, T., OKADA, A., TOZAWA, K., HAYASHI, Y., KOHRI, K. A polymorphism of the osteopontin gene is related to urinary calcium stones. **Journal of Urology**, v.174, p.1472-1476, 2005.

GARLOW, J.E., KA, H., JOHNSON, G.A., BURGHARDT, R.C., JAEGER, L.A., BAZER, F.W. Analysis of osteopontin at the maternal-placental interface in pigs. **Biology of Reproduction**, v.66, p.718-725, 2002.

GIUDICE, L.C. Potential biochemical markers of uterine receptivity. **Human Reproduction**, v.14, p.3-16, 1999.

GENBACEV, O.D., PRAKOBPHOL A., FOLK, R.A., KRTOLICA A.R., ILIC, D., SINGER, M.S., YANG, Z., KIESSLING, L.L., ROSEN S.D., FISHER S.J. Trophoblast L-selectin-mediated cell adhesion at the maternal-fetal interface. **Science**, v. 299, p. 405-407, 2003.

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

GUILLOMOT, M., FLECHON, J.E., WINTENBERG-TORRES, S. Conceptus attachment in the ewe: an structural study. **Placenta**, v.2, p.169-182, 1981.

GOULART, L.R., VIEIRA, G.S., MARTELLI, L., INÁCIO, J., GOULART, I.M., FRANCO, J.G.Jr. Is MUC1 polymorphism associated with female infertility? **Reproductive Biomedicine Online**, v.8, p.477-482, 2004.

FISHER, L.W., TORCHIA, D.A., FOHR, B., YOUNG, M.F., FEDARKO, N.S. Flexible structure of SIBLING protein, bone sialoprotein and osteopontin. **Biochemical Biophysical Research Communications**, v.280, p.460-465, 2001.

HANISCH, F-G., MÜLLER, S. MUC1: the polymorphic appearance of a human mucin. **Glycobiology**, v.10, p.439-449, 2001.

HENRIQUES S., TAPIA, A., QUEZADA, M., VARGAS, M., CARDENAS, H., RIOS, M., SALVATIERRA, A.M., CROXATTO, H., ORIHUELA, P., ZEGERS-HOCHSCHILD, F., MUNROE, D.J., VELASQUEZ, L. Deficient expression of monoamine oxidase A in the endometrium is associated with implantation failure in

women participating as recipient in oocyte donation. **Molecular Human Reproduction**, v.12, p.749-754, 2006.

HENS, J.R., ROGERS, J.W., HUOTT, M.L., PATTON, S. Association of epithelial mucin, PAS-1, with yield, health and reproductive traits in Holstein dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.78, p.2473-2480, 1995.

HEY, N.A., MESEGUER, M., SIMON, C., SMORONDINSKY, N.I., WRESCHNER D.H., ORTIZ, M.E., APLIN, J.D. Transmembrane and truncated (SEC) isoforms of MUC1 in the human endometrium and Fallopian tube. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.30, p.1-11, 2003.

HEY, N.A., GRAHAM, R.A., SEIF, M.W., APLIN J.D. The polymorphic epithelial mucin MUC1 in human endometrium is regulated with maximal expression in the implantation phase. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.78, p.337-42, 1994.

HILD-PETITO, S., FAZLEABAS, A.T., JULIAN J., CARSON D.D. Mucin (Muc-1) expression is differentially regulated in uterine luminal and glandular and glandular epithelia of the Baboon (*Papio Anubis*). **Biology of Reproduction**, v.54, p.939-947, 1996.

HOFFMAN, L.H., OLSON, G.E., CARSON, D.D., CHILTON, B.S. Progesterone and implanting blastocysts regulate Muc1 expression in rabbit uterine epithelium. **Endocrinology**, v.139, p.266-271, 1998.

HORNE, A.W., WHITE, J.O., MARGARA, R.A., WILLIAMS, R., WINSTON, R.M.L., LALANI, E. MUC1: a genetic susceptibility to infertility? **The Lancet**, v.357, p.1336-1337, 2001.

HOTTE, S.J., WINQUIST, E.W., STITT, L., WILSON, S.M., CHAMBERS, A.F. Plasma osteopontin: associations with survival and metastasis to bone in men with hormone-refractory prostate carcinoma. **Cancer**, v.95, p.506-512, 2002.

JONHSON, G.A., SPENCER, T.E., BURGHARDT, R.C., BAZER, F.W. Ovine osteopontin I. Cloning and expression of mRNA in the uterus during the peri-implantation period. **Biology of Reproduction**, v.61, p.884-891, 1999.

JONHSON, G.A., BURGHARDT, R.C., SPENCER, T.E., NEWTON, G.R., OTT, T.L., BAZER, F.W. Ovine osteopontin II: Osteopontin and  $\alpha\beta 3$  integrin expression in the uterus and conceptus during periimplantation period. **Biology of Reproduction**, v.61, p.892-899, 1999.

JONHSON, G.A., BAZER, F.W., JAEGER, L.A., KA, H., GARLOW, J.E., PFARRER, C., SPENCER, T.E., BURGHARDT, R.C. Muc-1, integrin, and osteopontin expression during the implantation cascade in sheep. **Biology of Reproduction**, v.65, p.820-828, 2001.

JOHNSON, G.A., BURGHARDT, R.C., BAZER, F.W., SPENCER, T.E. Osteopontin: Roles in implantation and placentation. **Biology of Reproduction**, v.69, p.1458-1471, 2003.

JONES, C.J., ORTIZ, M.E., CROXATTO, M.B., MANZUR, A., SLEVIN, G., APLIN J.D. Muc1 and glycan expression in the oviduct and endometrium of a new world monkey *Cebus paella*. **Biology of Reproduction**, v.64, p.1535-1544, 2001.

KAO, L.C., TULAC, S., LOBO, S., IMANI, B., YANG, J.P., GERMEYER, A., OSTEEEN, K., TAYLOR, R.N., LESSEY, B.A., GIUDICE, L.C. Global Gene Profiling in Human Endometrium during the Window of Implantation. **Endocrinology**, v.143, p.2119-2138, 2002.

KERR, J.M., FISHER, L.W., TERMINE, J.D., YOUNG, M.F. The cDNA cloning and RNA distribution of the bovine osteopontin. **Gene**, v.108, p.237-243, 1991.

KIEFER, M.C., BAUER, D.M., BARR, P.J. The cDNA and derived aminoacid sequence for human osteopontin. **Nucleic Acids Research**, v.17, p.3306. 1989.

LEONARD, S., KHATIB, H., SCHUTZKUS, V., CHANG, Y.M., MALTECCA, C., Effects of the osteopontin gene variants on milk production traits in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.88, p.4083-4086, 2005.

LÔBO, R.B., BEZERRA, L.A.F., OLIVEIRA, H.N., MAGNABOCO, C.U., ALBUQUERQUE, L.G., BERGMANN, J.A.G., SAINZ, R.D., BARROS, P.S. Avaliação genética de touros e matrizes da raça Nelore. In: **Sumário 2006**. ANCP. (2006).

LUEDTKE, C.C., MCKEE, M.D., CYR, D.G., GREGORY, M., KAARTINEN, M.T., MUI, J., HERMO, L. Osteopontin expression and regulation in the testis, efferent ducts, and epididymis of rats during postnatal development through to adulthood. **Biology of Reproduction**, v.66, p.1437-1448, 2002.

MALYANKAR, U.M., SCATEN, M., SUCHLAND, K.L., YUN, T.J., CLARK, E.A., GIACHELLI, C.M. Osteoprotegerin is an alpha v beta 3-induced, NF-kappa B dependent survival factor for endothelial cells. **Journal of Biological Chemistry**, v.275, p.20959-20962, 2000.



MARCIANO, R., GIACOPELLI, F., DIVIZIA, M.T., GATTORNO, M., FELICI, E., PISTORIO, A., MARTINI, A., RAVAZZOLO, R., PICCO, P. A polymorphic variant inside the osteopontin gene shows association with disease course in oligoarticular juvenile idiopathic arthritis. **Annals of Rheumatism Diseases**, v.65, p.662-665, 2006.

MESEGUER, M., APLIN J.D., CABALLERO-CAMPO, P., O'CONNOR, J.E., MARTIN, J.C., REMOHÍ, J., PELLICER, A., SIMÓN, C. Human endometrial mucin MUC1 is up-regulated by progesterone and down-regulated in vitro by the human blastocyst. **Biology of Reproduction**, v.64, p.590-601, 2001.

MITSUTA, K., YOKOYAMA, A., KONDO, K., NAKAJIMA, M., ARITA, K., KOHNO, N. Polymorphism of the MUC1 mucin gene is associated with susceptibility to lung adenocarcinoma and poor prognosis. **Oncology Reports**, v.14, p.185-189, 2005.

MONIAUX, N., ESCANDE, F., PORCHET, N., AUBERT, J.P., BATRA, S.K. Structural organization and classification of the human mucin genes. **Frontiers in Bioscience**, v.6, p.1192-1206, 2001.

MOORE, M.A., GOTOH, Y., RAFIDI, K., GERSTENFELD, L. Characterization of cDNA for chicken osteopontin expression during bone development, osteoblast differentiation, and tissue distribution. **Biochemistry**, v.30, p.2501-2508, 1991.

NAITO, M., MATSUI, A., INAO, M., NAGOSHI, S., NAGANO, M., ITO, N., EGASHIRA, T., HASHIMOTO, M., MISHIRO, S., MOCHIDA, S., FUJIWARA, K. SNP in the promoter region of the osteopontin gene as a markers predicting the efficacy of interferon-based therapies in patients with chronics hepatitis C. **Journal of Gastroenterology**, v.40, p.381-388, 2005.

NARDO, L.G., SABATINI, L., RAI, R., NARDO, F. Pinopode expression during human implantation. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v.101, p.104-108, 2002.

OLDBERG, A., FRANZEN, A., HEINEGARD, D. Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell binding sequence. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.83, p.8819-8823, 1986.

OLERUP, O., ZETTERQUIST, H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: An alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. **Tissue Antigens**, v.39, p.225-235, 1992.

OMIGBODUN, A., ZIOLKIEWICZ, P., TESSLER, C., HOYER, J.R., COUTIFARIS, C. Progesterone regulates osteopontin expression in human trophoblasts: a mode of paracrine control in the placenta. **Endocrinology**, v.138, p.4308-4315, 1997.

PALLESEN, L.T., ANDERSEN, M.H., NIELSEN, L.R. BERGLUND, L., PETERSEN, T.E., RASMUSSEN, L.K. Purification of MUC1 from bovine milk-fat globules and characterization of a corresponding full-length cDNA clone. **Journal of Dairy Science**, v.84, p.2591-2598, 2001.

PASSARGE, E. Polimorfismo. In: Genética: Texto e atlas. **Editora Artmed**. 2ª Edição. V.64, 2004.

PATTON, S., GENDLER, S.J., SPICER, A.P. (1995) the epithelial mucin, MUC1, of milk, mammary gland and other tissues. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1241, p.407-424, 1995.

PEREIRA, J.C.C. Melhoramento Genético Aplicado à Produção Animal. 4ª ed. Belo Horizonte: **FEPMVZ**, 2004.

PERRIER D'HAUTHERIVE, S., CHARLET-RENARD, C., GOFFIN, F., FOIDART, M., GEENEN, V. The implantation window. **Journal of Gynecologie, obstetrique et biologie de la reproduction**, v.5, p.440-455, 2002.

POLINELI, P., ARAGONDA, P., FURUTA, R., ADELSON D.L. The bovine QTL viewer: A web accessible database of bovine Quantitative Trait Loci. **BMC Bioinformatics** 7: 283. 2006.

RASERO, R., SACCHI, P., ROSATI, S., CAUVIN, E., MAIONE, S. Molecular analysis of the length polymorphic MUC1 gene in cattle. **Journal of Animal Breed and Genetics**, v.119, p.342-349, 2002.

RUOSLAHTI, E., PIERSCHBACHER, M.D. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. **Science**, v.238, p.491-497, 1987.

SACCHI, P., CAROLI, A., CAUVIN, E., MAIONE, S., SARTORE, S., SOGLIA, D., RASERO, R. Analysis of the MUC1 gene and its polymorphism in *Capra hircus*. **Journal of Dairy Science**, v.87, p.3017-3021, 2004.

SACCHI, P., MACCHI, E., RASERO, R., FIANDRA, P. Two new variants of the bovine PAS-1 glycoprotein. **Animal Genetics**, v.26, p.197-198, 1995.

SAS. SAS 9.1.3. Cary: SAS Institute Inc., (2003).

SCHANABEL, R.D., KIM, J.J., ASHWELL, M.S., SONSTEGARD, T.S., VAN TASSEL, C.P., CONNOR, E.E., TAYLOR J.F. Fine-mapping milk production quantitative trait loci on BTA6: analysis of the bovine osteopontin gene. **Proceedings of National Academy of Science USA**, v.102, p.6896-6901, 2005.

SHARKEY, A.M. The endometrium as a cause of implantation failure. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v.17, p.289-307, 2003.

SILVA, F., CARVALHO, F., PEIXOTO A., SEIXAS, M., ALMEIDA, R., CARNEIRO, F., MESQUITA, P., FIGUEIREDO, C., NOGUEIRA, C., SWALLOW, D.M., AMORIM, A., DAVID, L. MUC1 gene polymorphism in the gastric carcinogenesis pathway. **European Journal of Human Genetics**, v.9, p.548-552, 2001.

SIMON, C., MARTIN, J.C., MESEGUER, M., CABALLERO-CAMPO, P., VALBUENA, D., PELLICER, A. Embryonic regulation of endometrial molecules in human implantation. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v.55, p.43-53, 2000.

SPENCER, T.E., JOHNSON, G.A., BAZER, F.W., BURGHARDT, R.C. Implantation mechanisms: insights from the sheep. **Reproduction**, v.128, p.657-668, 2004.

SOUZA, F.R.P., DENTILLO, D.B., MEOLA, J., BIASE, F.H., ANDRÉA, M.V., VOZZI, P.A., LÔBO, R.B., MARTELLI, L.R. The polymorphism in MUC1 gene in Nelore cattle. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v.123, p.1-5, 2007.

SPICER, A.P., DUHIG, T., CHILTON, B.S., GENDLER, S.J. Analysis of mammalian MUC1 genes reveals potential functionally important domains. **Mammalian Genome**, v.12, p.885-888, 1995.

SURVEYOR, G.A., GENDLER, S.J., PEMBERTON, L., DAS, S.K., CHAKRABORTY, I., JULIAN, J., PIMENTAL, R.A., WEGNER, C.C., DEY, S.K., CARSON, D.D. Expression and steroid hormonal control of Muc-1 in the mouse uterus. **Endocrinology**, v.136, p.3639-3647, 1995.

TABIBZADEH, S. Molecular control of the implantation window. **Human Reproduction Update**, v.4, p.465-471, 1998.

TEZUKA, K., SATO, T., KAMIOKA, H., NIJIWEIDE, P.J., TANAKA, K., MATSUO, T., OHTA, M., KURIHARA, N., HAKEDA, Y., KUMEGAWA, M. Identification of osteopontin in isolated rabbit osteoclasts. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.186, p.911-917, 1992.

VERSTREPEN K.J., JANSEN A., LEWITTER F., FINK G.R. Intragenic tandem repeats generate functional variability. **Nature. Genetics**, v.37, p.986–990, 2005.

YAMADA, O., TODOROKI, J., TAKAHASHI, T., HASHIZUME, K. The dynamic expression of extracellular matrix in the bovine endometrium at implantation. **Theriogenology**, v.64, p.207-214, 2001.

WESSELING, J., VAN DER VALK, S.W., HILKENS, J. A mechanism for inhibition of E-cadherin mediated cell-cell adhesion by the membrane associated mucin epsialin/MUC1. **Molecular Biology of the Cell**, v.7, p.565-577, 1996.

WESSELING, J., VAN DER VALK, S.W., VOS H.L., SONNENBERG, A., HILKENS, J. Epsialin (MUC1) overexpression inhibits integrin-mediated cell adhesion to extracellular matrix components. **The Journal of the Cell Biology**, v.129, p.255-265, 1995.

WHITE, S.N., CASAS, E., ALLAN, M.F., KEELE, J.W., SNELLING, W.M., WHEELER, T.L., SHACKELFORD, S.D., KOOHMARAIE, M., SMITH, T.P. Evaluation in beef cattle of six deoxyribonucleic acid markers developed for dairy traits reveals an osteopontin polymorphism associated with postweaning growth. **Journal of Animal Science**, v.85, p.1-10, 2007.

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

# ***ANEXOS***

*Anexo 1 – Avaliação genética*

Tabela: DEPs dos progenitores paternos das novilhas utilizadas do 2º grupo (LÔBO et al., 2006).

<b>Touro <sup>(1)</sup></b>	<b>MP 120</b>	<b>DP 120</b>	<b>DP 365</b>	<b>DP 450</b>	<b>PE 365</b>	<b>PE 450</b>	<b>DIPP</b>	<b>DPG</b>	<b>DPA</b>	<b>DPAC</b>
<b>1</b>	1,80	3,18	14,06	15,45	0,51	0,90	-0,68	-0,14	21,4	3,39
<b>2</b>	1,33	4,11	14,37	16,88	1,15	1,87	-0,18	0,09	8,66	2,51
<b>3</b>	0,06	0,10	5,95	3,83	0,72	1,01	-0,06	-0,27	-2,05	-0,78
<b>4</b>	0,20	5,37	12,34	15,54	-0,44	-0,64	0,22	0,30	12,5	5,00
<b>5</b>	1,63	7,21	19,22	22,62	1,08	1,19	0,09	-2,12	45,3	3,93
<b>6</b>	2,17	5,77	10,63	9,59	0,93	1,66	-0,40	1,10	10,3	5,81
<b>7</b>	2,21	2,12	7,25	7,19	0,52	1,12	-1,02	0,68	21,5	6,40
<b>8</b>	1,91	4,51	12,96	14,59	0,57	0,81	-0,06	-1,62	31,7	3,75
<b>9</b>	0,27	5,30	14,14	15,75	0,54	0,68	-0,49	-1,96	23,7	2,95
<b>10</b>	0,89	6,54	12,41	11,25	1,46	1,92	-1,29	-1,00	18,9	6,67
<b>11</b>	2,40	8,26	16,37	18,24	1,02	1,25	-0,91	-0,42	20,2	7,76
<b>12</b>	-0,58	6,54	15,56	13,44	0,41	0,09	-0,26	-2,64	6,27	1,01
<b>13</b>	0,25	4,06	12,27	11,72	1,62	1,42	0,02	0,38	5,52	0,67
<b>14</b>	3,39	5,02	12,02	13,32	0,41	0,70	-1,19	3,13	30,0	6,32
<b>15</b>	1,69	5,11	14,80	15,31	0,36	0,43	-0,93	-0,01	11,3	7,21
<b>16</b>	0,51	3,27	10,21	11,33	0,05	-0,17	-0,80	-0,30	24,3	5,77
<b>17</b>	-0,37	2,77	10,04	10,13	-0,31	-0,34	-0,65	1,75	21,2	3,71
<b>18</b>	-0,18	4,16	6,84	1,89	0,66	0,69	-0,68	0,07	13,6	2,96
<b>19</b>	0,36	2,19	9,36	9,00	-0,38	-0,74	-0,96	0,65	27,9	3,16
<b>20</b>	-3,06	6,41	14,56	17,65	0,13	0,29	-0,46	-0,02	24,0	1,03
<b>21</b>	0,62	7,40	14,31	16,45	-0,52	-0,37	-0,04	-0,46	17,9	0,30
<b>22</b>	0,67	5,49	11,70	12,80	0,28	0,18	0,21	-0,57	3,00	-0,27
<b>23</b>	2,78	5,44	13,09	15,20	0,58	0,70	-1,27	3,69	23,9	3,60
<b>24</b>	1,69	4,95	15,22	17,54	1,22	1,40	-0,43	0,36	26,5	5,67
<b>25</b>	1,75	3,32	8,17	9,09	0,45		-0,81	1,93	20,0	2,57
<b>26</b>	1,07	5,07	18,10	21,99	1,06		-0,44	-1,94	16,1	2,26
<b>27</b>	2,01	1,59	7,28	5,62	1,23		-0,62	1,21	25,2	5,93
<b>28</b>	2,26	4,52	11,68	12,32	0,54		-0,75	2,85	16,2	3,05
<b>29</b>	0,08	3,50	11,72	14,32	0,09		-0,46	1,26	25,4	1,58
<b>30</b>	2,82	2,58	6,90	7,79	0,63		-0,82	1	26,33	3,60
<b>31</b>	2,97	4,57	16,7	20,43	0,57		-0,87	3	25,36	2,87
<b>32</b>	-1,31	2,32	6,54	-9,79	-0,60		-0,15	-2,97	7,63	-0,21
<b>33</b>	0,00	2,11	10,38	14,01	0,03		-0,71	-1,86	11,34	2,06
<b>34</b>	-0,14	4,26	12,94	11,88	0,89		-0,14	-0,56	3,11	0,33
<b>35</b>	-2,71	2,42	6,99	4,90	0,40		-1,15	2,6	19,89	-3,00

*Anexo 2 - Soluções*

## Tampão de lise

Sucrose .....	0.32 M
Tris – HCl .....	12 mM pH 7.5
MgCl <sub>2</sub> .....	5.0 mM
Triton-X.....	1.0%

## Tampão de proteinase K

NaCl.....	0.375 M
EDTA (pH8.0).....	0.12 M

## Tampão estoque de eletroforese

Tris-base.....	0.089 M
Ácido bórico.....	0.089 M
EDTA 0.5 M (pH 8.0).....	0.002M

Dissolver em 800ml de água MilliQ e completar o volume para 1.000ml.

## Tampão de eletroforese e de gel de agarose

TBE 10X.....	50 ml
Água MilliQ.....	950ml

## Tampão Loading Buffer

Solução A .....	250µl
Glicerol.....	300µl
Água MilliQ .....	450µL

## Solução A

Água MilliQ.....	8ml
Bromofenol blue.....	0.1g
Xilenocianol.....	0.1g

Completar para 10 $\mu$ L de água MilliQ.

## SDS 20%

SDS.....	2g
Água MilliQ.....	10ml

## Solução estoque de brometo de etídeo

Brometo de etídeo.....	0.05g
Água MilliQ .....	5ml

## Solução de brometo de etídeo

Solução estoque de brometo de etídeo.....	20 $\mu$ L
Água destilada.....	400 $\mu$ L

## Solução com marcador molecular 1 KB Plus DNA Ladder

Marcador 1KB Plus DNA Ladder.....	10 $\mu$ L
Tampão Loading.....	10 $\mu$ L
Água MilliQ.....	30 $\mu$ L



**Anexo 3 – Sequência GenBank DQ 644555**

LOCUS DQ644555 967 bp DNA linear MAM 14-DEC-2006  
 DEFINITION Bos indicus MUC1 (mucin) gene, partial sequence.  
 ACCESSION DQ644555  
 VERSION DQ644555.1 GI:112553044  
 KEYWORDS .  
 SOURCE Bos indicus (Bos taurus indicus)  
 ORGANISM [Bos indicus](#)  
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;  
 Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Cetartiodactyla; Ruminantia;  
 Pecora; Bovidae; Bovinae; Bos.  
 REFERENCE 1 (bases 1 to 967)  
 AUTHORS Souza,F.R.P., Dentillo,D.B., Meola,J., Biase,F.H., Andrea,M.V.,  
 Vozzi,P.A., Lobo,R.B. and Martelli,L.R.  
 TITLE MUC1 Genetic Polymorphism in Nellore Breed Bovines  
 JOURNAL Unpublished  
 REFERENCE 2 (bases 1 to 967)  
 AUTHORS Souza,F.R.P., Dentillo,D.B., Meola,J., Biase,F.H., Andrea,M.V.,  
 Lobo,R.B. and Martelli,L.R.  
 TITLE Direct Submission  
 JOURNAL Submitted (12-APR-2006) Genetics, University of Sao Paulo, 3900  
 Bandeirantes Avenue, Ribeirao Preto, SP 14049-900, Brazil  
 FEATURES  
 source Location/Qualifiers  
 1..967  
 /organism="Bos indicus"  
 /mol\_type="genomic DNA"  
 /db\_xref="taxon:[9915](#)"  
 /chromosome="3"  
 /PCR\_primers="fwd\_seq: cgcagaactacgccagtttcc, rev\_seq:  
 agagcgggtgggtcatggatg"  
 /note="breed: Nellore"  
[gene](#) <1..>967  
 /gene="mucin"  
 /note="MUC1; VNTR region"  
 ORIGIN  
 1 gaacggtaac aagcagccac gtccagtccc actaaagaaa cttcttgagg cacaactacc  
 61 accttactca cagccagcag cctgccccca agcccggctg ctctccaggc cacgacggag  
 121 cctcgactcc aaccagcagc cctgccccaa gccagctgn ctctccaggc cacaacggca  
 181 cctcgtctcc gaccggcagc cctgccccaa gccagctgc ctctccaggc cacgatggag  
 241 cctcgactcc aaccagcagc cctgccccaa gccggctgc ctctccagga cacgacggag  
 301 cctcgactcc aaccagcagc cctgccccaa gccagctgc ctctccaggc cacgacggag  
 361 cctcgactcc aaccagcagc cctgccccaa gccggctgc ctctccaggc cacaacggga  
 421 cctcgtctcc gactggcagc cctgccccaa gccagctgc ctctccaggc catgacggag  
 481 cctcgactcc aaccagcagc cctgccccaa gccggctgg ctctcaggnc acaatggcac  
 541 ctcgtctcca gaccggcagc ncctgcccc aagcccaact ggctctccag gacacgacgg  
 601 agcctcagat ccaaacagaa gccctgcccc aagcccgggt ggctctccag ggcaacaacg  
 661 ggagactcgt tccagacttg ggaagccctt gccccaagcc cagcttgctt ttcagggggac  
 721 caatggaacg ggaagccctt cggaaatttc cngaaacnaa ggatgacccc tgggctcccc  
 781 caaaagcacc gagtgtggcg ttcttccatg ggcccagaca ntgaggnaaa cctccanant  
 841 tcaccaaaaca cggggaagag cacntggaca ccaaagaggc aaatggcca cntcacangg  
 901 gccagaanaa gtggcncaaa tcccaaacac ganaacctt gggcccaang ccacgatggc  
 961 tctcacg

//

**Anexo 4 – Sequência GenBank EF094946**

LOCUS EF094946 1011 bp DNA linear MAM 20-DEC-2006  
 DEFINITION Bos indicus mucin (MUC1) gene, partial sequence.  
 ACCESSION EF094946  
 VERSION EF094946.1 GI:119443902  
 KEYWORDS .  
 SOURCE Bos indicus (Bos taurus indicus)  
 ORGANISM [Bos indicus](#)  
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;  
 Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Cetartiodactyla; Ruminantia;  
 Pecora; Bovidae; Bovinae; Bos.  
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1011)  
 AUTHORS Souza,F.R.P., Dentillo,D.B., Meola,J., Biase,F.H., Andrea,M.V.,  
 Vozzi,P.A., Lobo,R.B. and Martelli,L.R.  
 TITLE MUC1 genetic polymorphism in Nelore Cattle  
 JOURNAL Unpublished  
 REFERENCE 2 (bases 1 to 1011)  
 AUTHORS Souza,F.R.P., Dentillo,D.B., Meola,J., Biase,F.H., Andrea,M.V.,  
 Vozzi,P.A., Lobo,R.B. and Martelli,L.R.  
 TITLE Direct Submission  
 JOURNAL Submitted (31-OCT-2006) Genetics, FMRP - USP, Avenida Bandeirantes,  
 Ribeirao Preto, SP 14049-900, Brazil  
 FEATURES Location/Qualifiers  
 source 1..1011  
 /organism="Bos indicus"  
 /mol\_type="genomic DNA"  
 /db\_xref="taxon:9915"  
 /chromosome="3"  
 /map="9260.656 - 9256.555"  
 /PCR\_primers="fwd\_seq: cgcagaactacgccagtttcc, rev\_seq:  
 agagcgggtggtcatggatg"  
 /note="breed: Nelore"  
[gene](#) <1..>1011  
 /gene="MUC1"  
 /note="mucin; coding region not determined; contains exon  
 2"  
 ORIGIN  
 1 tggAACGGTA acaagcagcc caacgtccag tcccacttaa agaaacttct tggagcacia  
 61 cttaccacct tactcacagc cagcagccct gcccAAGCC cggctgcctc tccaggccac  
 121 gacggagcct cgactccaac cagcagccct gcccAAGCC cagctgcctc tccaggccac  
 181 aacggcacct cgtctccgac cggcagccct gcccAAGCC agctgcctct ccaggccacg  
 241 atggagcctc gactccaacc agcagccctg ccccAAGCC ggctgcctct ccaggacacg  
 301 accggagcct cgactccaac cagcagccct gcccAAGCC cagctgcctc tccaggacac  
 361 gaccggagcc tgcactccaa ccagcagccc tgcccAAGC ccgactgac tctccaggcc  
 421 acaacggcaa cctcgtactc tgactggcag cctgaccca agcccantgc cctactccag  
 481 gccatgacgg agcctcgact ccaaacagca gcacctgcc aagcccggnt gcctctccag  
 541 gacacagatg gagcctacga actacnacn agacagccct gcccAAGCC agctgcctct  
 601 ccaggacacg acaggagcct tacggactcc aacagcaagc ctgacccaaa ggcccggttg  
 661 cctctccagg ccacaatggg aaagcctcga attaccgaac acaggcagac ctngacccca  
 721 aagccacagt ngctatactt accaagagga cacaagaaag ggagaggccc nacggaacnt  
 781 acaaaaccca nggaaagncc ccttaggacc cnaaaagnnc ccagggtttg gacntttacc  
 841 gagnggcaca acgaaacggg ggacgagnt ntccaaatcc aaacaaanga agcatngccc  
 901 ccaancacca agatagacat ttntacagag agaccacaga tagagnanca cacgacgaat  
 961 gcacaaacca aagaaagccg agcgcaccaca agcccngtta ggcagatcac g

//

***MANUSCRITO***

## SHORT COMMUNICATION

**The polymorphism in MUC1 gene in Nelore cattle**

F. R. P. de Souza<sup>1</sup>, D. B. Dentillo<sup>1</sup>, J. Meola<sup>1</sup>, F. H. Biase<sup>1</sup>, M. V. Andréa<sup>2</sup>, P. A. Vozzi<sup>1</sup>, R. B. Lôbo<sup>1</sup>, L. R. Martelli<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, SP, Brazil

<sup>2</sup> Departamento de Zoocenia, Centro de Ciências Agrárias e Ambientais, Universidade Federal da Bahia, Cruz das Almas, BA, Brazil

**Keywords**

Cattle; molecular marker; PCR; VNTR

**Correspondence**

Lucia Martelli, Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 3900, Avenida Bandeirantes, 14049-900, Ribeirão Preto, SP, Brazil. Tel.: 55(16)3602-3081; Fax: 55 (16)3602-3076; E-mail: lrmartel@fmrp.usp.br

Received: 24 April 2006;  
accepted: 7 December 2006

**Summary**

MUC1 is a transmembrane glycoprotein expressed on the apical surfaces of the uterine epithelial tissue with predicted functions in protection and cell–cell adhesion. These properties are closely related with the repetitive region [variable number of tandem repeats (VNTR)] of the extracellular domain and with the O-glycosylation in their serine and threonine residues. This study describes a polymerase chain reaction (PCR) protocol to analyse MUC1 bovine genetic polymorphism and demonstrates the existence of a VNTR within the sites for O-glycosylation. Oligonucleotide primers based on the *Bos taurus* mucin (MUC1) gene sequence GenBank AF399757 were used to amplify five VNTR MUC1 alleles from a study group of 56 pure Nelore bovines. The number of repeats varied between 10 and 24, being more prevalent than the alleles with less number of repeats. The DNA sequence analysis revealed two repeats and one of them presented 100% homology with the bovine consensus sequence already reported. The second repeat showed codons that translate to serine and proline amino acids, which are conserved in the MUC1 of several species. This study is the first description of allelic variation and the VNTR structure in the Nelore breed MUC1 gene, and we suggest that this genetic variability can be tested for association with variation in reproductive traits in Nelore cattle.

**Introduction**

MUC1 is a transmembrane glycoprotein mucin exclusively expressed in apical mammalian epithelial tissues (Duraismy et al. 2006). The broad functions of this glycoprotein are cell surface protection, lubrication and cell–cell adhesion but the glycoprotein can also play a role in growth, fetal development, renewal and in epithelial differentiation (Moniaux et al. 2001). In the female reproductive tract, MUC1 has been associated with embryo implantation control where it is thought to provide a barrier between the blastocyst and the epithelial cells of the endometrium (Brayman et al. 2004). For this role, studies of gene expression during implantation in ovines and other species show progesterone-dependent down-

regulation of MUC1 in the uterus (Johnson et al. 2001).

The structure of the MUC1 molecule is well defined in many species, including bovines. In Danish Holstein cattle, the mature protein comprises 558 amino acid residues that constitute a phosphorylated cytoplasmic tail, a hydrophobic transmembrane domain and an extracellular domain that includes an SEA domain, and a highly polymorphic variable number of tandem repeats (VNTR) region that encodes 20 amino acids. With the exception of this VNTR region, all the other domains of MUC1 are highly conserved (Pallensen et al. 2001). The VNTR region has also been called PTS because of the proline, threonine and serine residues that constitute the *consensus* amino acid sequence. The threonine

and serine residues serve as sites for the O-glycosylation responsible for both positive and negative adhesive properties of the molecule. The proline residues are associated with this role, giving the molecule an extended form and raising it well above the surface of the cell membrane (Patton et al. 1995; Gendler 2001; Dekker et al. 2002).

In the eight species studied, the PTS-conserved consensus amino acid sequence included one serine and two proline residues highly conserved. The remaining sequence presents high content of these residues with a significant degree of conservation (Pallensen et al. 2001; Rasero et al. 2002; Sacchi et al. 2004). The lack of perfect conservation between species is caused by the position of these residues varying within the repeat, as the VNTR varies in length. In bovines and caprines the repeats can show 80–100% of homology with the derived PTS consensus repeat. In Italian Friesian and Piedmontese breeds all repeats in the VNTR share on average 93% DNA sequence homology with the consensus sequence. In mouse MUC1, this homology between repeats is down to 75% on average (Rasero et al. 2002; Sacchi et al. 2004).

DNA polymorphism in the VNTR of dairy cattle and caprines has been used for association studies with improved selection schemes in mind. In taurus bovine subspecies, four alleles for the VNTR region have been described with size ranging from 778 base-pairs (bp) to approximately 1600 bp (Rasero et al. 2002; Sacchi et al. 2004).

The role of the MUC1 protein in the uterine environment suggests it may be an informative marker for variation in fertility traits. The aim of this study was thus to develop a polymerase chain reaction (PCR) protocol for analysing polymorphism of the MUC1 VNTR in the Brazilian Nelore breed for future association studies of traits such as early puberty, and the success rate of embryo implantation obtained with in vitro fertilization techniques (IVF).

## Materials and Methods

### Sample collection

The study material comprised DNA derived from 56 pure Nelore breed fertile cows selected in the Program for Genetic Improvement of the Nelore Breed (PMGRN) at the FMRP – University of Sao Paulo, Brazil. The sample was characterized by low values of relationship coefficient and inbreeding. We found a similar effective number of founders as reported by Vozzi et al. (2006) on the breed indicating that the sample was representative of the Brazilian Nelore cattle.<sup>a</sup>

### DNA extraction

Molecular genetic analysis was performed on genomic DNA obtained by extraction from peripheral blood lymphocytes. DNA was extracted by precipitation in NaCl using standard techniques (Olerup & Zetterquist 1992).

### MUC1 polymorphism analysis

The forward and reverse primer sequences (5'-CGC AGA ACT ACG CCA GTT TCC-3' and 5'-AGA GCG GGT GGT CAT GGA TG-3') were based on the bovine sequence GenBank AF399757 and adapted from the primer sequences which flank the repetitive VNTR region of the bovine MUC1 published by Rasero et al. (2002). About 100 ng of genomic DNA was mixed with 15 pmol of each primer in a total volume of 25 µl containing 200 µM of each dNTP, 0.75 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.5 U of Platinum Pfx Taq DNA polymerase, Platinum Pfx Amplification Buffer and PCR Enhancer Solution (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), both in the concentration of 1X. PCR was performed on a Whatman Biometra TGradient Thermocycler at the following conditions: a denaturation step at 95 °C for 5 min, 35 cycles of 95 °C for 40 s, 58 °C for 40 s, 68 °C for 1 min and 30 s, and a final extension step of 68 °C for 5 min. The amplified fragments were checked in a 1.5% agarose gel electrophoresis prepared with 0.5X Tris–borate–ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) buffer. The gel was photographed and allele lengths were estimated by the software Kodak Digital Science 1D Image Analysis Software with the Marker 1 kb Plus DNA Ladder molecular weight standard.

### DNA sequencing and VNTR fragment analysis

Polymerase chain reaction purification derived from two independent Nelore homozygotes (no. 28 and no. 41 in Figure 1b) for the same allele (1036 bp) was performed with GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences, Pittsburgh, PA, USA). For quantification, the samples were applied in a 2% agarose gel with Low DNA Mass Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The sequencing was performed in the MegaBACE™1000 Analysis System (Amersham Biosciences) with DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit and Thermo Sequenase™II DNA Polymerase and the sequence information was entered into GenBank as DQ644555 on 12 April 2006. The sequences were analysed by the Sequence Analyzer software using the Base Caller Cimarron 3.12 (Amersham Biosciences, Pittsburgh



A		B	
Amino acids sequence  (Pallensen et al., 2001)		VNTR Sequence	
Nucleotides sequence		Sample # 28 	
		Sample # 41 	
C		D	
Present study (Nelore cattle)		Rasero et al. 2002	
Allele length (bp)	Number of repeats	Allele length (bp)	Number of repeats
1036	10	778	10
1175	12	958	13
1323	15	1078	15
1526	18	1600	24
1894	24		

Figure 1 MUC1 Gene repeat organization: (a) nucleotides and predictive amino acids sequences of each repeat. Conserved amino acids are shown in bold. The underlined nucleotides indicate the differences between the sequences. (b) Schematic representation of the VNTR sequence to show the organization of the MUC1 VNTR repeat in samples no. 28 and no. 41. The consensus sequence is black, and the second repeat is dark grey. The non-repeat sequence and low homology sequences are represented by striped and white boxes, respectively. (c) Allele length and the respective number of repeats in *Bos taurus indicus* (present study). (d) Allele length and the respective number of repeats in previous study of *Bos taurus taurus* (Rasero et al. 2002).

PA, USA). Both purification and sequencing reactions were performed by the DNA sequencing and PCR products purification services of Human Genome Research Center (CEGH).

Chromas software (<http://www.technelysium.com.au>) was used to compare the homology with other sequences in GenBank. The Tandem Repeat Finder Program (<http://tandem.bu.edu/trf/trf.html>) was used to identify and count the number of repetitions of the sequence (Benson 1999). The estimation of the number of repeats in other alleles was performed utilizing the following formula:

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

where ETR is the size (bp) of the non-repeat sequence, NCR the bp number in the consensus repeat, NR the number of repeats in the 1036 sequence and L1036 bp the bp length of the allele 1036.

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

where X is the allele, NTR the number of repeats and FNS the allele length.

## Results

Five alleles were identified in the VNTR MUC1 locus and they were initially named according to the size, based on estimates provided by the Image Analysis Software (Figure 2). The 1036-bp allele was the most prevalent, followed by the 1323 and 1175-bp alleles. The 1526 and 1894 bp alleles were the least frequent (Table 1).

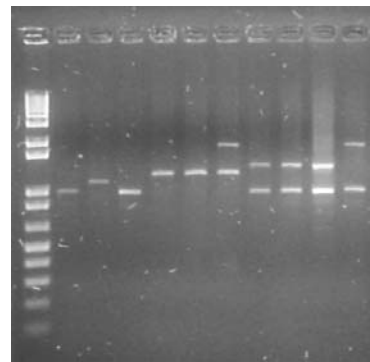


Figure 2 Gel electrophoresis showing the PCR products of 10 DNA samples. From left to right: 1 kb Plus DNA Ladder, alleles 1036, 1175, 1036, 1323, 1323, 1323/1894, 1036/1526, 1036/1526, 1036/1526 and 1036/1894 bp. Sizes are estimated by algorithm Kodak Digital.

The sequencing of two independent samples from animals (no. 28 and no. 41) homozygous for the 1036 bp allele gave rise to sequences of 967 bp (GenBank DQ644555) and 1011 bp long. In both sequences, Tandem Finder Repeat analysis demonstrated a VNTR formed by 10 repeats. The no. 28 sequence showed four repeats which share 100% of homology with the *consensus* repeat originally described by Pallensen et al. (2001) and Rasero et al. (2002). The other six repeats comprised sequences with partial homology to the *consensus* repeat, named 'imperfect' sequence by Rasero et al. (2002). Two of them presented the codons that translate to serine and proline in conserved positions between all species that have been studied to date. The VNTR

Table 1 Allelic and genotypic frequencies in 56 Nelore cattle

Allele	Frequency	Genotype	Frequency
1036	0.71	1036/1036	0.5
1175	0.107	1036/1175	0.17
1323	0.133	1036/1323	0.17
1526	0.026	1036/1526	0.053
1894	0.0178	1036/1894	0.017
		1175/1175	0.017
		1323/1323	0.035
		1323/1894	0.017

sequence of the sample no. 41, comprised four consensus repeats, and six imperfect repeats. One imperfect repeat showed conserved codons for proline and serine residues. The number of repeats in the other alleles was estimated to be 12, 15, 18 and 24. With the exception of the alleles with 12 and 18 repeats, the other alleles were described in *Bos taurus taurus* by Rasero et al. (2002) (Figure 1c,d).

### Discussion

Mucin genes are characterized by the unusual presence of intragenic repeats within the transcript. Most genes with variable number of tandem repeats (VNTR) in the coding region are surface proteins involved in cell–cell interactions. The quantitative alterations in the cell-surface phenotypes are manifested as differential adhesiveness and different levels of flocculation in cells (Verstrepen et al. 2005). The wide variability in the functional efficiency of these molecules arises from length variation of the functional VNTR, caused by misalignment of tandem repeats and unequal crossing-over at meiosis.

In the reproductive tract of rodents, pigs and ruminants, the glycoprotein MUC1 is repressed by progesterone control at the time of embryo implantation. During the same period, in humans and rabbits, progesterone stimulates uterine MUC1 expression, and its repression is limited to the site of embryo implantation. These studies suggest that variables in the VNTR region of the molecule can influence the interaction between the embryo and uterine luminal cells by 'steric hindrance' or different patterns of O-glycosylation (Aplin et al. 2001).

For the function involving differential cellular adhesiveness, the MUC1 VNTR polymorphisms have been associated with genetic susceptibility to increased risk for metastasis in gastric carcinoma and for infertility (Carvalho et al. 1997; Horne et al. 2001; Goulart et al. 2004). In goats and bovines, MUC1 has been associated with yield, health and reproductive

traits (Hens et al. 1995; Patton et al. 1995; Sacchi et al. 2004). The present study shows five new allelic variations in the Nelore cattle in which the alleles with 12 and 18 repeats have not been previously described in *Bos taurus* Piedmontese and Italian Friesian cattle (Rasero et al. 2002). The higher frequency of the alleles with minor sizes presented in this study is in contrast to the report of Sacchi et al. (2004) who found the prevalence of alleles with moderate sizes in five cattle breeds.

The *consensus* sequence described by Spicer et al. (1995), differs from the sequence described by Pallesen et al. (2001) and from the findings we present. This variation may reflect genetic differences among breeds or exemplify the relative instability of the VNTR region in these populations. Despite the variation in the extent of homology for some repeats, the repeats typically maintain proline, threonine and serine residues, suggesting that the major selective pressure for MUC1 protein is to maintain the potential O-glycosylation sites.

We conclude that the high variability of MUC1 polymorphism in Brazilian Nelore cattle, the VNTR structure, and the presence of codons that translate for serine and threonine residues in the VNTR *consensus* sequence provide new information for finding association between the polymorphisms at the gene and the variation in fertility traits in cattle. In addition to these traits, the polymorphism may be associated with other economically important characteristics relevant to these breeds such as yield and overall health.

### Acknowledgements

This work was supported by CAPES, ANCP and PRONEX/CNPq. We thank Dr Jeremy A. Squire from University of Toronto for suggestions and text revision.

### References

- Aplin J.D., Meseguer M., Simo'n C., Ortiz M.E., Croxatto H., Jones C.J.P. (2001) MUC1 glycans and the cell-surface barrier to embryo implantation. *Biochem. Soc. Trans.*, **29**, 153–156.
- Benson G. (1999) Tandem repeats finder: a program to analyse DNA sequences. *Nucleic Acids Res.*, **27**, 573–580.
- Brayman M., Thathiah A., Carson D.D. (2004) MUC1: A multifunctional cell surface component of reproductive tissue epithelia. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, **2**, 4.
- Carvalho F., Seruca R., David L., Amorim A., Seixas M., Bennett E., Clausen H., Sobrinho-Simões M. (1997)

- MUC1 gene polymorphism and gastric cancer – an epidemiological study. *Glycoconj. J.*, 14, 107–111.
- Dekker J., Rossen J.W., Buller H.A., Einerhand A.W. (2002) The MUC1 Family: an obituary. *Trends Biochem. Sci.*, 3, 126–131.
- Duraisamy S., Ramasamy S., Kharbanda S., Kufe D. (2006) Distinct evolution of the human carcinoma-associated transmembrane mucins, MUC1, MUC4 and MUC16. *Gene*, 373, 28–34.
- Gendler S.J. (2001) MUC1, the renaissance molecule. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, 6, 339–353.
- Goulart L.R., Vieira G.S., Martelli L., Ina'cio J., Goulart I.M., Franco J.G., Jr (2004) Is MUC1 polymorphism associated with female infertility? *Reprod. Biomed. Online*, 8, 477–482.
- Hens J.R., Rogers G.W., Huot M.L., Patton S. (1995) Association of the epithelial mucin, PAS-1, with yield, health and reproductive traits in Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 78, 2473–2480.
- Horne A.W., White J.O., Margara R.A., Willians R., Winston R.M.L., Lalani E.-N. (2001) MUC1: a genetic susceptibility to infertility? *Lancet*, 357, 1336–1337.
- Johnson G.A., Bazzler F.W., Jaeger L.A., Ka H., Garlow J.E., Pfarrer C., Spencer T.E., Burghardt R.C. (2001) Muc-1, integrin and osteopontin expression during the implantation cascade in sheep. *Biol. Reprod.*, 65, 820–828.
- Moniaux N., Escande F., Porchet N., Aubert J.P., Batra S.K. (2001) Structural organization and classification of the human mucin genes. *Front. Biosci.*, 6, 1192–1206.
- Olerup O., Zetterquist H. (1992) HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens*, 39, 225–235.
- Pallensen L.T., Andersen M.H., Nielsen R.L., Berglund L., Petersen T.E., Rasmussen L.K., Rasmussen J.T. (2001) Purification of MUC1 from bovine milk-fat globules and characterization of a corresponding full-length cDNA clone. *J. Dairy Sci.*, 12, 2591–2598.
- Patton S., Gendler S.J., Spicer A.P. (1995) The epithelial mucin, MUC1, of milk, mammary gland and other tissues. *Biochim. Biophys. Acta*, 1241, 407–424.
- Rasero R., Sacchi P., Rosati S., Cauvin E., Maione S. (2002) Molecular analysis of the length polymorphic MUC1 gene in cattle. *J. Anim. Breed. Genet.*, 119, 342–349.
- Sacchi P., Caroli A., Cauvin E., Maione S., Sartore S., Soglia D., Rasero R. (2004) Analysis of the MUC1 gene and its polymorphism in *Capra hircus*. *J. Dairy Sci.*, 87, 3017–3021.
- Spicer A.P., Duhig T., Chilton B.S., Gendler S.J. (1995) Analysis of mammalian MUC1 genes reveals potential functionally important domains. *Mamm. Genome*, 12, 885–888.
- Verstrepen K.J., Jansen A., Lewitter F., Fink G.R. (2005) Intragenic tandem repeats generate functional variability. *Nat. Genet.*, 37, 986–990.
- Vozzi P.A., Marcondes C.R., Magnabosco C.U., Bezerra L.A.F., Lobo R.B. (2006) Structure and genetic variability in Nelore (*Bos indicus*) cattle by pedigree analysis. *Genet. Mol. Biol.*, 29, 482–485.