

## Identificação molecular do helminto *Haemonchus contortus* e de polimorfismo no gene da $\beta$ -tubulina

Juliana Gracielle Gonzaga Gromboni<sup>1</sup>; Talita Ribeiro Gagliardi<sup>1</sup>; Suelen Scarpa Mello<sup>1</sup>; Juliana Giusti<sup>2</sup>; Erika Turim<sup>3</sup>; Cecília José Veríssimo<sup>4</sup>; Marcelo Beltrão Molento<sup>5</sup>; Simone Cristina Méo Niciura<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Aluna de graduação em Ciências Biológicas, Centro Universitário Central Paulista, São Carlos, SP, [jgracielle@hotmail.com](mailto:jgracielle@hotmail.com);

<sup>2</sup>Aluna de graduação em Zootecnia, FMVZ-UNESP, Botucatu, SP;

<sup>3</sup>Aluna de graduação em Medicina Veterinária, Centro Universitário Barão de Mauá, Ribeirão Preto, SP;

<sup>4</sup>Pesquisadora do Instituto de Zootecnia, Nova Odessa, SP;

<sup>5</sup>Professor do Departamento de Medicina Veterinária, UFPR, Curitiba, PR;

<sup>6</sup>Pesquisadora da Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP.

Um dos maiores entraves na criação de ovinos é a alta prevalência de helmintos gastrintestinais, dos quais o mais patogênico é o *Haemonchus contortus*. Técnicas de biologia molecular permitem a identificação rápida e precisa de espécies de helmintos e de polimorfismos em genes relacionados à resistência a anti-helmínticos, como a transverso T > A na posição 200 no gene da  $\beta$ -tubulina. Dessa maneira, o objetivo deste trabalho foi padronizar as técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR) para a genotipagem de larvas individuais de helmintos obtidas de ovinos. Larvas infectantes oriundas de coprocultura foram destinadas à extração de DNA com fenol e clorofórmio. A seguir, foi realizada nested-PCR seguida por digestão com enzima de restrição (RFLP), para a identificação da espécie, ou por sistema de amplificação por mutação refratária (ARMS), para a identificação do polimorfismo gênico. As PCR foram constituídas por 1X de tampão, 0,25  $\mu$ M de *primer*, 0,2 mM de dNTP, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> e 1 U de Taq DNA polimerase em 20  $\mu$ L e 40 ciclos de amplificação. Na primeira reação da nested-PCR, foram utilizados 2  $\mu$ L de DNA (equivalente a 0,2 larva) e os *primers* 5'-TCGTTCTTCAGGAGGCAAGT-3' e 5'-TGCAGACAGTGGAGCAAAAAC-3', a 55°C de anelamento. Na segunda reação, foi utilizado 1  $\mu$ L do produto da primeira PCR e os *primers* 5'-GGAACAATGGACTCTGTTCG-3' e 5'-GAATCGAAGGCAGGTTCGT-3', a 54°C de anelamento. O produto da nested-PCR foi submetido à RFLP com 1 U de *RsaI* por 3 h a 37°C. Na reação de ARMS, foi utilizado 0,5  $\mu$ L do produto da segunda nested-PCR, os *primers* externos 5'-AAATAAGTCTCACACCTGTAAAC-3' e 5'-CCAGACATTGTGACAGACACTTCA-3' e 0,20  $\mu$ M dos *primers* internos 5'-CTGGTAGAGAACCGATGAAACATA-3' (específico para o alelo A) e 5'-CAGAGCTTCGTTGTCAATACGGA-3' (alelo T), a 58°C de anelamento. Foi observado que o *Haemonchus contortus* apresentou padrão de bandas de 440, 185 e 147 pares de bases (pb) após RFLP. Após ARMS, foi possível identificar que os helmintos homozigotos para o alelo A apresentaram padrão de bandas de 295 e 198 pb, os homozigotos para o alelo T, 296 e 146 pb e os heterozigotos AT, 296, 198 e 146 pb. Esta metodologia de genotipagem irá permitir o diagnóstico do nível de infecção de rebanhos ovinos por *H. contortus* e a frequência de polimorfismos gênicos relacionados à resistência a anti-helmínticos.

**Apoio financeiro:** Embrapa e CNPq/PIBIC.

**Área:** Genética / Reprodução Animal / Sanidade Animal / Melhoramento Animal