

Identificação de polimorfismos no gene da glicoproteína-P (PgP) em *Haemonchus contortus*: dificuldades técnicas

Suelen Scarpa de Mello¹; Marina Ibelli Pereira Rocha¹; Rodrigo Giglioti²; Flavia Aline Bressani³; Wilson Malagó-Jr³; Simone Cristina Méo Niciura⁴.

¹Aluna de mestrado em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, suelen.sm@gmail.com;

²Aluno de doutorado em Genética e Melhoramento Animal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP;

³Apoio técnico, Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP.

⁴Pesquisadora, Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP.

Entre os parasitas de ovinos, o *Haemonchus contortus* é o mais patogênico, prevalente e que acarreta os maiores prejuízos econômico. O diagnóstico precoce da resistência por meio de técnicas moleculares é uma excelente ferramenta de manejo dos anti-helmínticos de maneira a orientar seu uso racional e a prolongar sua eficácia. A finalidade deste estudo é desenvolver um teste molecular para a detecção precoce da resistência múltipla a anti-helmínticos em *H. contortus*. O alvo do estudo é o gene da glicoproteína-P (PgP), que codifica uma proteína responsável pelo efluxo de várias drogas do interior das células e cujas modificações são associados à resistência. Para tanto, *H. contortus* do isolado susceptível e do isolado com resistência múltipla a anti-helmínticos Embrapa 2010 foram recuperados de hospedeiros ovinos mantidos na Embrapa Pecuária Sudeste após infecção experimental. Quarenta parasitas (20 susceptíveis e 20 resistentes) adultos de *H. contortus* foram destinados, individualmente, à extração de DNA com solvente orgânico. A seguir, procedeu-se a amplificação por PCR de um fragmento de 870 pb do gene da PgP, segundo o protocolo descrito por Blackhall et al. (2008). Foi encontrada dificuldade na amplificação por PCR e, por isso, foram feitas várias modificações nas condições de reação, como aumento da concentração de magnésio, modificação na temperatura de anelamento e inclusão de BSA e DMSO na reação. Para algumas amostras, o fragmento desejado foi amplificado, purificado da reação de PCR com a enzima ExoSAP-IT e destinado ao sequenciamento capilar. Entretanto, a qualidade do sequenciamento foi ruim, provavelmente devido à ocorrência de fragmentos inespecíficos. Uma vez que a sequência do PgP de *H. contortus* (GenBank AF003908) refere-se ao mRNA e não ao DNA, há dificuldade no desenho de outros *primers* para amplificação do gene, pois não há como saber a localização das junções éxon-éxon e nem o tamanho exato do produto a ser amplificado (idealmente até 600 bp para sequenciamento). Assim, visando identificar possíveis íntrons e seus tamanhos, foi feito o alinhamento do mRNA do PgP de *H. contortus* com a sequência do gene PGP-2 (Gene ID: 172262) do nematoide modelo *C. elegans*, no programa Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Foram identificados 5 possíveis íntrons, os maiores com 202 e 900 bp e, com essa informação, novos *primers* foram desenhados e várias modificações nas condições de PCR foram testadas. Mesmo assim, apesar de funcionar em poucas amostras não houve amplificação para a maioria do DNA extraído. Dessa maneira, concluímos que os problemas observados podem ser devidos aos *primers* utilizados ou à baixa quantidade de DNA presente nos parasitas, o que requer a amplificação via nested-PCR. Assim, novas tentativas de amplificação serão feitas com *pool* de vermes adultos, com reações de nested-PCR e com novos *primers* recém encomendados.

Apoio financeiro: Embrapa/ CAPES.

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