

ANÁLISES GENÉTICAS APLICADAS À SELEÇÃO DE BÚFALOS (BUBALUS BUBALIS) PARA CARNE DE QUALIDADE

Rafael Pereira da Silva¹²¹

Luciana Gatto Brito¹²²

Audrey Bagon¹²³

RESUMO: A carne de búfalo é considerada um alimento nobre, tanto pelo seu valor nutricional, como pelos aspectos sensoriais extremamente desejáveis. A utilização de técnicas de biologia molecular nos estudos de genoma bubalino permite identificar indivíduos com genótipos favoráveis para a produção de carne. Dentre os genes de interesse para programas de melhoramento genético de bubalinos podemos citar o gene da leptina, associado a características de interesse pecuário como a deposição de gordura na carcaça, produção de leite, capacidade de consumo, conversão alimentar, bem como características reprodutivas. O objetivo do presente trabalho foi caracterizar e selecionar pares de primers para PCR-RFLP provenientes de estudos do genoma bubalino para o gene da leptina. Três pares de iniciadores foram desenhados com base na sequência da região promotora e exon 1 do gene da leptina bubalina depositada no Genbank (AY495586), para a amplificação por PCR de fragmentos a partir do DNA genômico extraído de sangue bubalino. A visualização do produto amplificado pela eletroforese em gel de agarose indicou que a PCR realizada com o primer LEPTBU1 apresentou banda bem definida de 474 pb, sem bandas inespecíficas. Em resumo, o primer LEPTBU1 é sensível e específico para identificar e caracterizar o fragmento do gene da leptina em bubalinos.

PALAVRAS – CHAVE: bubalino, primers, leptina

ABSTRACT: The buffalo meat is considered a noble food, for its nutritional value and the sensory aspects extremely desirable. The use of molecular techniques in the buffalo genome studies is able to identify individuals with favorable genotypes for meat production. Among the genes of interest for breeding programs of buffaloes can cite the leptin gene, has been associated with the manifestation of characteristics of livestock interest as the deposition of fat in the carcass, milk production, consumption capacity, feed, and and reproductive characteristics. The objective of this study was to characterize and select primers for PCR-RFLP studies with the leptin gene in buffalo. Three pairs of primers were designed based on the sequence of the promoter region and exon 1 of the buffalo leptin gene deposited in Genbank (AY495586), for amplification by PCR fragments from genomic DNA extracted from blood buffalo. The visualization of the amplified product by agarose gel electrophoresis indicated that the PCR performed with primer LEPTBU1 presented a well-defined band of 474 bp without nonspecific bands. In summary, the primer LEPTBU1 is sensitive and specific to identify and characterize the gene fragment of leptin in buffaloes.

KEYWORDS: bubaline, primers, leptin

¹²¹ Bolsista PIBIC/CNPq – Embrapa. 8º período de Medicina Veterinária.

¹²² Pesquisadora da Embrapa – RO e Orientadora.

¹²³ Bolsista DCR/CNPq- Embrapa – RO.

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, a produção de carne de búfalos vem passando por grandes modificações, desde os conceitos de produção animal e melhoramento genético, até aqueles relacionados à identificação, caracterização e garantia de qualidade. A carne bubalina é considerada um alimento nobre para o homem, tanto pelo seu valor nutricional, como pelos aspectos sensoriais extremamente desejáveis. Considerando as grandes modificações ocorridas na forma de utilização da terra para agricultura e pecuária e os recentes avanços sobre segurança alimentar, ocorreram novas exigências para uma alimentação saudável aliada à qualidade de vida. Neste sentido, a carne de búfalo passa a ser uma importante fonte proteica alternativa para a alimentação humana (OLIVEIRA, 2005).

O uso de marcadores moleculares principalmente de DNA, permite que o potencial genético de um animal seja determinado com maior precisão, antes mesmo da expressão do seu fenótipo (REGITANO e COUTINHO, 2001), resultando em maior acurácia da seleção, que invariavelmente proporcionará melhor retorno econômico da atividade.

A metodologia utilizada neste trabalho para a identificação de marcadores relacionados à manifestação das características de interesse para a produção de carne foi realizada através da análise do gene candidato.

O gene da leptina é responsável pela síntese de um hormônio envolvido com os mecanismos de regulação da ingestão de alimentos e com o metabolismo energético, prevenindo a deposição excessiva de gordura corporal (CHILLIARD et al., 2001). Devido às funções fisiológicas desempenhadas, esse gene foi considerado como alvo para ser analisado geneticamente através da técnica da PCR-RFLP, por influenciar as características produtivas em bubalinos.

O presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de selecionar iniciadores e validar um protocolo para a reação de PCR-RFLP, visando identificar e selecionar matrizes bubalinas onde as análises moleculares serão utilizadas como ferramentas auxiliares na escolha dos animais superiores para a produção de carne.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de sangue sem EDTA de 407 búfalos da raça Murrah e mestiços, foram coletadas de diferentes propriedades nos estados de Rondônia e Bahia e enviadas para o

laboratório de biologia molecular da Embrapa Rondônia para a extração de DNA, formação do banco de dados e posteriores análises genéticas.

Alinhamento dos genes da leptina bovina e bubalina

A partir do website do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), o gene da leptina das espécies *Bubalus bubalis* (AC: AY495587), e *Bos indicus* (AC: U50365), foram localizados e posteriormente alinhados, utilizando-se o programa computacional DNAMAN®.

Extração de DNA

O primeiro passo para a extração de DNA a partir de amostras sanguíneas sem EDTA, foi a quebra mecânica do coágulo realizada segundo a metodologia descrita por Brito et al. (2006). Tecidos de nylon, cortados em círculos de 10 cm de diâmetro, foram fixados a tubos e moldados manualmente em forma de funil e fixados com liga de borracha. Os coágulos previamente quebrados eram depositados no fundo deste funil e submetidos a uma centrifugação a 15000 rpm por 5 minutos. A extração de DNA das amostras a partir do coágulo centrifugado e do sangue total se deu através da utilização do kit GFX™ Genomic Blood DNA Purification (Amersham Pharmacia Biotech, UK), seguindo as recomendações do fabricante.

Em um microtubo de 1,5 mL foram colocados 300 µL de sangue e 900 µL de solução de lise. A amostra foi homogeneizada e centrifugada a 12000 rpm por 20 segundos e o sobrenadante foi descartado. 500 µL de solução de extração foi adicionada para incubar em temperatura ambiente por 5 minutos. O volume eluído foi desprezado e novamente foram adicionados 500 µL de solução de extração na coluna, sendo submetida às mesmas condições de centrifugação anteriores. O conteúdo do tubo coletor foi novamente descartado e 500 µL de solução de lavagem foram adicionados para a centrifugação a 8000 rpm durante 3 minutos. A coluna foi transferida para um microtubo de 1,5 mL, limpo e livre de enzimas que possam decompor o DNA. 100 µL de TE, aquecido a 70°C foi adicionado e por 1 minuto incubado em temperatura ambiente. A solução de DNA foi obtida após a centrifugação a 5000 rpm por 1 minuto. O material extraído foi estocado a -80°C até o momento da análise.

Reação em cadeia da Polimerase (PCR)

Teste de primers desenhados a partir do gene da leptina bovina

As reações foram realizadas em volume total de 25 μ L em cada tubo contendo 12,5 μ L de PCR Mastermix (Ready Mix™, Sigma), 2 μ L de cada primer (10 μ M) e 5 μ L da amostra de DNA bovino ou bubalino. As temperaturas de anelamento para os primers LEPT1, LEPT2 e LEPT3, foram respectivamente 65,7°C, 66°C e 68°C. Os referidos primers, desenhados e descritos por Salman e Giachetto (2008) com base na seqüência do gene da leptina bovina depositada no Genbank (AC: U50365), foram testados com amostras de DNA bubalino. O produto amplificado correu em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídeo para a identificação do tamanho, em pares de base (pb).

Teste de primers desenhados a partir do gene da leptina bubalina

Para a realização do PCR-RFLP, foram desenhados 3 pares de primers com base na seqüência da região promotora e exon 1 do gene da leptina bubalina depositada no Genbank (AY495586), através do programa Gene Runner©.

Uma enzima de restrição também foi selecionada de acordo com a região de amplificação do gene. Para a escolha dos primers foram consideradas suas posições na seqüência de DNA e dos sítios de restrição referente à enzima selecionada.

Para a otimização da PCR, ajustaram-se as concentrações dos componentes da reação. As reações foram realizadas em volume total de 25 μ L em cada tubo contendo 12,5 μ L de PCR Mastermix (Ready Mix™, Sigma), 1 μ L de cada primer (10 μ M) e 5 μ L da amostra de DNA bubalino (com concentração aproximada de 100ng/ μ L). Em relação à amplificação no termociclador, foram avaliadas diferentes combinações de tempo e temperatura, incluindo o touchdown PCR. Os produtos resultantes foram separados em gel de agarose 1,5%, corados com brometo de etídeo e visualizados com UV.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A identidade encontrada através do alinhamento entre os genes da leptina bovina e bubalina foi de 79,39%.

Os resultados obtidos pela técnica de PCR realizados com o DNA bovino apresentaram o mesmo tamanho de migração, de 644 pb para o par de primer Lept1, 482 pb para o par de primer Lept2 e 689 pb para o par de primer Lept3, conforme relatado por Salman e Giachetto

4. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos até o momento permitiram concluir que o par de primers LEPTBU 1 desenvolvidos para a amplificação da região promotora do gene da leptina bubalina (AY495586), demonstrou confiabilidade e poderão ser utilizados para a técnica da PCR-RFLP. Após essa etapa de padronização, pretende-se dar continuidade ao estudo, testando-se a enzima de restrição BfaI selecionada pelo programa Gene Runner® para a identificação do polimorfismo descrito por Vallinoto et al., 2004.

5. REFERÊNCIAS

- BRITO, L.G.; OLIVEIRA, M.C.S.; MOURA, M.M.F.; NETTO, F.G.S.; CAVALCANTE, F.A.; MARIM, A.D.; SOUZA, G.C.R.; SILVA, J.L. Extração de DNA a partir de coágulos sanguíneos bovinos. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento Embrapa Rondônia**, Porto Velho, V.43, 2006.
- CHILLIARD, Y.; BONNET, M.; DELAVAUD, C; FAULCONNIER, Y.; C. LEROUX, C.; DJIANE, J.; BOCQUIER, F. Leptin in ruminants. Gene expression in adipose tissue and mammary gland, and regulation of plasma concentration. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 21, p. 271-295, 2001.
- OLIVEIRA, A.F.M.; QUIRINO, C.R.; ADONA, P.R.; PACHECO, A. Aspectos da comercialização de carne e leite de bubalinos na região Norte Fluminense. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.29, n.1, p.53-54, 2005.
- OLIVEIRA, A.L. Búfalos: produção, qualidade de carcaça e de carne. Alguns aspectos quantitativos, qualitativos e nutricionais para promoção do melhoramento genético. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.29, p.122-134, 2005.
- REGITANO, L. C. A.; COUTINHO, L. L. *Biologia Molecular aplicada à Produção Animal*. Brasília: **EMBRAPA**, 2001.
- SALMAN, A.K.D.; RAPHAEL, B.C.; GIACHETTO, P.F. Gene da Leptina em Ruminantes. **REDVET**. Vol. VIII, Nº 12, 2007.
- SALMAN, A.K.D.; GIACHETTO, P.F. Identificação de polimorfismos no gene da leptina bovina. **Comunicado Técnico 336, Embrapa**, Porto Velho, Dezembro, 2008.
- VALLINOTO, M.; SCHNEIDER, M.P.C.; SILVA, A.; IANNUZZI, L.; BRENIG, B. Molecular cloning and analysis of the swamp and river buffalo leptin gene. **International Society for Animal Genetics**, v.35, p. 462-504.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq – PIBIC, EMBRAPA-RO.

CONTATOS**Orientando:** Rafael Pereira da Silva**E-mail:** rafa_p.s@hotmail.com**Orientador:** Luciana Gatto Brito**E-mail:** luciana@cpafro.embrapa.br