

**Caracterização de polimorfismos no
gene da leptina e do hormônio de
crescimento em rebanhos bubalinos**

ISSN 1677-8618
Agosto, 2013

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Rondônia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 71

Caracterização de polimorfismos no gene da leptina e do hormônio de crescimento em rebanhos bubalinos

Luciana Gatto Brito
Audrey Bagon
Ana Karina Dias Salman
Fábio da Silva Barbieri
Marivaldo Rodrigues Figueiró
Maria Vanderly Andréa
José Ribamar Felipe Marques
Cíntia Righetti Marcondes

Embrapa Rondônia
Porto Velho, RO
2013

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Rondônia

BR 364 km 5,5, Caixa Postal 127, CEP 76815-800, Porto Velho, RO
Telefones: (69) 3901-2510, 3225-9387, Fax: (69) 3222-0409
www.cpafrro.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Cléber de Freitas Fernandes*

Secretárias: *Marly de Souza Medeiros* e *Sílvia Maria Gonçalves Ferradaes*

Membros:

Marília Locatelli

Rodrigo Barros Rocha

José Nilton Medeiros Costa

Ana Karina Dias Salman

Luiz Francisco Machado Pfeifer

Fábio da Silva Barbieri

Maria das Graças Rodrigues Ferreira

Normalização: *Daniela Maciel*

Editoração eletrônica: *Marly de Souza Medeiros*

Revisão gramatical: *Wilma Inês de França Araújo*

1ª edição

1ª impressão (2013): 100 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

CIP-Brasil. Catalogação-na-publicação.
Embrapa Rondônia.

Caracterização de polimorfismos no gene da leptina e do hormônio de crescimento em rebanhos bubalinos / Luciana Gatto Brito ... [et al].-- Porto Velho, RO: Embrapa Rondônia, 2013.
19 p. – (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Rondonia, 1677-8618; 71)

1. Bubalinocultura. 2. *Bubalus bubalis*. 3. Variabilidade Genética. 4. Marcador Molecular. 5. Leptina. 6. Hormônio do crescimento. I. Brito, Luciana Gatto. II. Bagon, Audrey. III. Salman, Ana Karina Dias. IV. Barbieri, Fábio da Silva. V. Figueiró, Marivaldo Rodrigues. VI. Andréa, Maria Vanderly. VII. Marques, José Ribamar Felipe. VIII. Marcondes, Cíntia Righetti. VIII. Título. IX. Série.

CDD (21.ed.) 636.292D

© Embrapa – 2013

Sumário

Resumo	5
Abstract	6
Introdução	7
Material e métodos	9
Animais	9
Colheita de material e extração de DNA	9
Padronização e otimização do ensaio PCR-RFLP para o gene da leptina e GH	10
Eletroforese em gel de agarose	10
Padronização do ensaio RFLP para os genes da leptina e GH	11
Determinação das frequências alélicas, genotípicas, erro padrão, heterozigosidade e teste do χ^2 para equilíbrio de Hardy-Weinberg	12
Resultados e discussão	14
Extração de DNA	14
Amplificação por PCR, análise RFLP e frequências alélicas para os genes da Leptina e GH	14
Conclusões	17
Referências	17

Caracterização de polimorfismos no gene da leptina e do hormônio de crescimento em rebanhos bubalinos

Luciana Gatto Brito¹

Audrey Bagon²

Ana Karina Dias Salman³

Fábio da Silva Barbieri⁴

Marivaldo Rodrigues Figueiró⁵

Maria Vanderly Andréa⁶

José Ribamar Felipe Marques⁷

Cíntia Righetti Marcondes⁸

Resumo

O Brasil possui o maior rebanho bubalino da América do Sul e das alternativas pecuárias destinadas à produção de carne e leite, o búfalo destaca-se pela qualidade nutricional da carne e do leite que produz. Buscando-se identificar polimorfismos tipo RFLP-PCR (*Restriction fragment length polymorphism - Polimerase Chain Reaction*) nos genes da leptina e do hormônio de crescimento (GH) foram genotipados 128 animais pertencentes a três grupos genéticos bubalinos selecionados para produção de leite. O DNA obtido foi submetido à amplificação com *primers* específicos estabelecidos para o estudo. Os produtos de PCR foram digeridos com enzimas de restrição para detecção dos polimorfismos leptina e GH visualizados em gel de agarose a 2,5%. A utilização da técnica de RFLP-PCR foi eficiente na genotipagem de bubalinos, e identificou a presença dos alelos W e P no gene *LEPTINA*, sendo o genótipo *LEP^{WW}* predominante nas populações bubalinas estudadas. Em relação ao gene do hormônio de crescimento (GH) foi possível se identificar os genótipos *GH^{WP}* e *GH^{WW}*.

Palavras chaves: genótipos, bubalinos, produção de carne, produção de leite.

¹ Médica Veterinária, D.Sc. em Ciências Veterinárias, pesquisadora da Embrapa Rondônia, Porto Velho, RO, luciana.gatto@embrapa.br

² Médica Veterinária, D.Sc. em Medicina Veterinária, Bolsista de Desenvolvimento Científico Regional do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), abagon14@yahoo.com.br

³ Zootecnista, D.Sc. em Zootecnia em 2003, pesquisadora da Embrapa Rondônia, Porto Velho, RO, ana.salman@embrapa.br

⁴ Médico Veterinário, D.Sc. em Ciências Veterinárias, pesquisador da Embrapa Rondônia, Porto Velho, RO, fabio.barbieri@embrapa.br

⁵ Médico Veterinário, M.Sc. em Medicina Veterinária, analista da Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, marivaldo.figueiro@embrapa.br.

⁶ Zootecnista, D.Sc. em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB, Cruz das Almas, BA, mariaandrea115@hotmail.com

⁷ Zootecnista, D.Sc. em Zootecnia, pesquisador da Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, ribamar.marques@embrapa.br

⁸ Zootecnista, D.Sc. em Ciências Biológicas, pesquisadora da Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP, cintia.marcondes@embrapa.br.

Characterization of polymorphisms in the leptin and growth hormone genes in buffalo herds

Abstract

Brazil has the largest buffalo herd of South America and may be consider an alternative for meat and milk production due to nutritional quality of its products. Looking for to identify polymorphisms RFLP-PCR (Restriction fragment length polymorphism - Polymerase Chain Reaction) in the genes for leptin and growth hormone (GH), 128 buffalos from three genetic groups selected for dairy production were genotyped. Purified DNA was subjected to PCR amplification with specific primers established for the study. The amplicons were digested with restriction enzymes to detection leptin and GH polymorphisms visualized on agarose gel 2.5%. The use of RFLP-PCR was effective in buffalo genotyping, and identified the presence of alleles W and P in LEPTIN gene. The genotype LEP^{WW} was predominant in the buffalo populations studied. Regarding the growth hormone (GH) gene was possible to identify the genotypes GH^{WP} GH^{WW} in the buffalo herds studied.

Key words: *Genotypes, buffalo, meat production, milk production*

Introdução

O búfalo doméstico (*Bubalus bubalis*) é originário da Índia e chegou ao Brasil entre 1890 e 1895, na Ilha de Marajó, Estado do Pará (TONHATI et al., 1999; MIRANDA, 1986; FONSECA, 1986). Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) o rebanho bubalino nacional é estimado em 1,2 milhões de cabeças, porém a Associação Brasileira dos Criadores de Búfalos estima que o rebanho bubalino nacional é de cerca de 3,5 milhões de cabeças, com crescimento anual entre 3% e 3,5% (BERNARDES, 2007). A região Norte concentra 63,5% do efetivo bubalino nacional, seguida das regiões Sul e Sudeste com 10,5% e 10,3% do efetivo dos animais, respectivamente, seguido das regiões Nordeste e Centro-oeste onde são criados 10,2% e 5,5% dos bubalinos (IBGE, 2010).

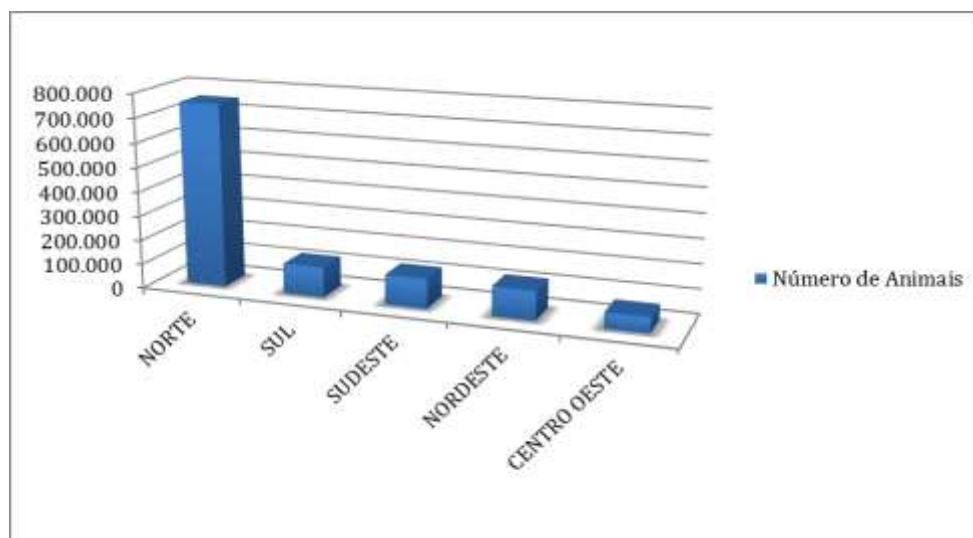


Gráfico 1. Distribuição do efetivo bubalino de acordo com as diferentes regiões geográficas brasileiras.

Das alternativas pecuárias destinadas a produção de carne e leite, o búfalo destaca-se pela qualidade nutricional da carne e do leite que produz. Os búfalos dividem-se em duas grandes famílias: búfalos de pântano e búfalos de rio. Na atualidade, no Brasil são exploradas quatro raças bubalinas:

- Carabau, a representante dos búfalos de pântano e utilizado principalmente para a tração;
- Jafarabadi, originária da Índia, de grande porte e muito pesados explorados principalmente para produção de carne, uma vez que podem chegar a atingir cerca de 1.600 kg de peso vivo, mas também podem ser utilizados para exploração leiteira;
- Murrah, de origem asiática e de conformação compacta e porte médio, possuem chifres curtos e espiralados, sendo no Brasil e na Índia a raça mais explorada para produção de leite;
- Mediterrânea, de origem italiana, porte médio, possuem chifres levemente voltados para cima, dupla aptidão produtiva, sendo na Itália mais exploradas para a produção de leite e no Brasil para produção de carne.

Por muito tempo no Brasil, considerou-se que a bubalinocultura era uma atividade pecuária alternativa à bovinocultura, uma vez que a rusticidade dos búfalos favorecia sua criação em regiões impróprias para o desenvolvimento dos bovinos. Porém, o que se tem observado é que a bubalinocultura vem se desenvolvendo como uma oportunidade pecuária em regiões onde criadores se organizaram e estabeleceram cadeias agroindustriais seja para produção de carne ou para o beneficiamento de lácteos (BERNARDES, 2007).

A maioria dos rebanhos bubalinos no Brasil é criada extensivamente para produção de carne e leite. Porém, sistemas semiextensivos para produção de leite tornam-se cada vez mais comuns no Brasil. Explorações semiextensivas para a bubalinocultura leiteira podem ser definidos como sistemas de produção direcionados a búfalos leiteiros com produção de 1.200 a 2.000 litros de leite por vaca ordenhada/ano, nos quais as vacas são criadas a pasto com suplementação volumosa na época seca. As características do leite de búfalas possibilitam a fabricação de derivados lácteos, tais como queijos, que vem experimentando um crescente aumento na comercialização em função de sua grande aceitação no mercado, sendo este um importante fator de elevação da renda média e fixação do homem no campo (TONHATI et al., 1999; BERNARDES, 2007).

Segundo Tonhati et al. (2006), nos países em desenvolvimento, a importância do melhoramento para o aumento da produção e melhoria da qualidade da carne e do leite é subestimada, provavelmente pelo fato de que a resposta à melhoria das condições ambientais é de fácil observação e a valorização econômica de um animal, até pouco há tempo, ter como base seus caracteres reprodutivos e raciais. Os ganhos de produção relacionados a seleção genética são muito evidentes no início do processo de seleção animal e necessitam de condições ambientais favoráveis à expressão do ganho genético, (LUSH, 1945). Portanto, a disseminação de ferramentas auxiliares aos processos de seleção e acasalamento, precedida pelo bom controle zootécnico do rebanho e o acompanhamento de técnicos qualificados são fundamentais para que a bubalinocultura experimente ganhos reais de produtividade e qualidade.

Outros autores citam a bubalinocultura como uma grande opção econômica e discutem as diversas formas de manejo, criação e melhoramento genético, inclusive o uso da genética molecular como ferramenta para o melhoramento e a associação de genes com as características produtivas (MACEDO et al.; 1995; DEL LAMA ; ZAGO, 1996; LARA, 1998; MARQUES et al., 1998; TONHATI et al., 1998; VASCONCELLOS; TONHATI, 1998; SENA et al., 2003; ALBUQUERQUE et al., 2005; BARBOSA et al., 2006; SENO et al., 2006; MALHADO et al., 2007; ANDRIGHETTO et al., 2008; MOITA et al., 2010).

No ano de 2004, foi lançado o segundo Sumário de Touros Bubalinos para produção de carne e leite, com base em 11.883 lactações e 7.808 controles de peso (RAMOS et al., 2004). Comparando-se com apenas dois dos programas de melhoramento desenvolvidos no país para a raça Nelore (SUMÁRIO..., 2010; LÔBO et al., 2010), onde cerca de 3.383.082 e 1.500.000 animais participaram da matriz de parentesco naquele ano, percebe-se que muito ainda tem que ser feito na espécie para se conseguir parâmetros e avaliações genéticas consistentes.

A utilização de técnicas moleculares possibilita a realização de estudos mais acurados dos genes envolvidos com características quantitativas, permitindo avanços significativos dos programas de melhoramento animal utilizando a seleção de matrizes assistidas por marcadores moleculares. A busca desses marcadores fundamenta-se primariamente na análise de polimorfismos em genes associados à manifestação de características de interesse econômico.

A identificação de mutações pontuais que podem ser utilizadas como marcadores genéticos para características de interesse econômico podem ser realizadas pelo uso de técnicas como a de RFLP-PCR (*Restriction fragment length polymorphism- Polimerase Chain Reaction*), uma técnica de alta confiabilidade e eficiência, de custo relativamente baixo e de fácil utilização para a detecção dos polimorfismos genéticos (ZADWORNÝ; KUHNLEIN, 1990). Marcadores moleculares são utilizados primordialmente para relacionar características alélicas quantitativas a informações gênicas individuais e suas interações, o que auxilia na análise da variação quantitativa da característica de interesse. A utilização destes marcadores em estudos de

variabilidade genética de populações pode, de maneira aplicada, ser correlacionada a características produtivas. Desta forma, a observação de polimorfismos em genes envolvidos ou que determinam a expressão quantitativa de caracteres de produção mostram-se promissores para utilização em programas de melhoramento genético, podendo também ser utilizados para a seleção de matrizes bubalinas superiores para produção de carne e leite.

Baseado nessas considerações, a utilização de marcadores moleculares em genes de interesse para produção, como os genes que regulam a produção de dois importantes hormônios para o metabolismo de mamíferos, o hormônio do crescimento (GH) e a leptina. O gene da leptina é responsável pela síntese de um hormônio envolvido em mecanismos metabólicos importantes, tais como a regulação da ingestão de alimentos e com o metabolismo energético que previne a deposição excessiva de gordura corporal e a produção de leite (CHILLIARD et al., 1998; CHILLIARD et al., 2001). A concentração de leptina aumenta com o estabelecimento da puberdade e está também associada ao ganho de peso em bovinos (GARCIA et al., 2002). O GH é apontado como um dos principais reguladores do crescimento pós-natal e do metabolismo em mamíferos. Portanto, o gene GH apresenta relevante importância na pecuária por causa da sua relação com a precocidade e ao ganho de peso, proporcionando o aumento da produção dos rebanhos em curto espaço de tempo (GE et al., 2003; ANDREA et al., 2011).

Considerando o escasso número de estudos direcionados à análise de genes que controlam características de interesse econômico em búfalos, buscou-se identificar a presença de polimorfismos do tipo RFLP-PCR nos genes da leptina e GH, a fim de identificar as frequências alélicas e genotípicas de búfalos pertencentes a três grupos genéticos estabelecidos nos estados de Rondônia e da Bahia.

Material e Métodos

Animais

Os animais amostrados neste estudo eram provenientes de dois rebanhos bubalinos leiteiros divididos em três grupos, totalizando 128 animais da raça Murrah e seus mestiços. O primeiro grupo (Buf1Med) era composto por 40 búfalos adultos; o segundo (Buf2Med) por 51 bezerros, ambos pertencentes ao rebanho bubalino estabelecido no campo experimental de Presidente Médici da Embrapa Rondônia. Esses animais foram genotipados para a avaliação da presença de polimorfismos nos genes da leptina e GH; o terceiro grupo em estudo (BufBA) era proveniente de um rebanho bubalino estabelecido no Município de São Sebastião do Passé, Bahia. Foram avaliadas 37 búfalas que foram genotipadas para a identificação de polimorfismo no gene da leptina.

Colheita de material e extração de DNA

Amostras de sangue total dos animais avaliados foram colhidas sem adição de anticoagulante por punção venosa da veia caudal com auxílio de tubos de polipropileno para coleta a vácuo. A extração de DNA se deu a partir da quebra mecânica do coágulo sanguíneo segundo a metodologia descrita por Brito et al. (2006). Para extração de DNA das amostras a partir do coágulo centrifugado utilizou-se kit comercial GFX™ Genomic Blood DNA Purification (Amershan Pharmacia Biotech, UK), seguindo as recomendações do fabricante. Em um microtubo de 1,5 mL foram colocados 300 μ L de sangue e 900 μ L de solução de lise. A amostra foi homogeneizada e centrifugada a 12.000 rpm por 20 segundos e o sobrenadante foi descartado. 500 μ L de solução de extração foram adicionados para incubar em temperatura ambiente por 5 minutos. O volume eluído foi desprezado e novamente foram adicionados 500 μ L de solução de extração na coluna, sendo submetida às mesmas condições de centrifugação anteriores. O conteúdo do tubo coletor foi

novamente descartado e 500 μ L de solução de lavagem foram adicionados para a centrifugação a 8.000 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. Após essa etapa, 100 μ L de Tris-EDTA (TE) aquecido a 70°C foi adicionado e incubado por 1 minuto 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. A quantificação do DNA foi realizada em gel de agarose a 1%.

Padronização e otimização do ensaio PCR-RFLP para o gene da leptina e GH

Para a realização da reação em cadeia da polimerase (PCR) foram identificadas três sequências nucleotídicas iniciadoras (*primers*) estabelecidas a partir da região promotora e do exon 1 do gene da leptina bubalina (*Genbank access number AY495586*). As sequências nucleotídicas iniciadoras foram estabelecidas a partir do *software* de análise de sequências nucleotídicas Gene Runner[®].

O par de *primer* LEPTBU1, foi o escolhido para a utilização das ampliações do gene da leptina por demonstrar maior eficiência nas reações de PCR. Os *primers* GH1 e GH2 foram desenhados e descritos por Mitra et al. (1995) com base na sequência do gene GH bubalino (*Genbank access number AJ011533*). As enzimas de restrição utilizadas no ensaio de análise dos fragmentos de restrição também foram selecionadas pelo programa Gene Runner[®], de acordo com a região de amplificação dos genes (Tabela 1).

Tabela 1. Sequências dos pares de bases dos iniciadores e enzimas de restrição selecionadas para os genes da leptina e do GH.

Nome do <i>primer</i>	Sequência	Posição no gene	Tamanho (pb)	Enzima de restrição
LEPTBU 1	5'-CTGACTTTCCTTACCCCT-3' 5'-ATAGCCGCCGAAGCACAAAC-3'	1 - 473 pb	474 pb	<i>Bfa</i> I
LEPTBU 2	5'-GGTTTCAGCCATACTTGC-3' 5'-ACTTACCTCGCTGCTGCT GG-3'	1 - 543 pb	544 pb	<i>Bfa</i> I
LEPTBU 3	5'-CATCCAGCAAACAGTAGAC-3' 5'-AGGAGAAAGGAGAGAGCC-3'	1 - 565 pb	566 pb	<i>Bfa</i> I
GH	5'-GCTGCTCCTGAGGGCCCTTCG-3' 5'-GCGGCGGCACTTCATGACCCT-3'	1 - 222 pb	223 pb	<i>Alu</i> I

Fonte: Elaborada pelos autores.

As variáveis otimizadas para a padronização da reação de PCR foram: temperatura de anelamento dos *primers*, quantidade de DNA e número de ciclos. As reações foram realizadas em volume total de 30 μ L. Os componentes e programas das reações de amplificação estão apresentados nas Tabelas 2 e 3.

Eletroforese em gel de agarose

As corridas eletroforéticas foram realizadas utilizando-se cerca de 5 μ L do produto de amplificação com adição de 3 μ L de tampão de corrida (Tris-HCl 0, 1 mM, pH 6, 8; azul de bromofenol 0,125%; glicerol 50%) em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídeo (0,5 μ g/mL) utilizando-se tampão tris borato edta (TBE) 1X, aplicando-se uma corrente de 140V/50mA por aproximadamente 30 minutos. Os produtos amplificados foram identificados por comparação com marcadores de peso molecular de 100 pares de bases (Ladder-Gibco BRL), em transluminador sob luz ultravioleta e fotografados com sistema de fotodocumentação LGC-030.

Tabela 2. Componentes e concentrações finais de componentes da PCR para os *primers* LEPTBU1 e GH.

Leptina			GH		
Componentes	Volume (μL)	Concentração final	Componentes	Volume (μL)	Concentração final
PCR Mastermix (Ready Mix™, Sigma)	15	-	PCR Mastermix (Ready Mix™, Sigma)	15	-
LEPTBU 1	1,2	10 μM	GH 1	1,0	20 μM
LEPTIBU 2	1,2	10 μM	GH 2	1,0	20 μM
DNA	7	100-150 ng/μL	DNA	7	100-150 ng/μL
Água livre de nucleases	5,6	-	Água livre de nucleases	6	-

Fonte: Elaborada pelos autores.

Tabela 3. Condições de amplificação utilizadas para os *primers* LEPTBU1 e GH.

Etapas	Primer LEPTBU1			Primer GH		
	Temperatura	Tempo	Nº de ciclos	Temperatura	Tempo	Nº de ciclos
Desnaturação inicial	96 °C	180 seg	1	94 °C	180 seg	1
<i>Amplificação</i>			35			35
Desnaturação	94 °C	60 seg		94 °C	45 seg	
Anelamento	55 °C	60 seg		61 °C	60 seg	
Extensão	72 °C	60 seg		70 °C	60 seg	
Resfriamento	4 °C	∞		4 °C	∞	

Fonte: Elaborada pelos autores.

Padronização do ensaio RFLP para os genes da leptina e GH

Após a amplificação dos fragmentos dos genes da leptina e GH os mesmos foram submetidos à digestão com endonucleases de restrição com 2U da enzima *Bfa* I (para o fragmento amplificado pelo *primer* LEPTBU1) e com 4U da enzima *Alu* I (para o fragmento amplificado pelo *primer* GH).

As reações de digestão foram incubadas por 3 horas a 37°C para ambas enzimas. A verificação da clivagem foi feita em gel de agarose 2,5% corado com brometo de etídio, sob eletroforese realizada com tampão TBE 1X, 180 V e posterior visualização em transiluminador sob luz ultravioleta. Os tamanhos dos fragmentos obtidos da digestão foram estimados utilizando-se marcador de peso molecular 100 pb (Easy Gen).

As Figuras 1 e 2 apresentam os mapas dos genes da leptina e GH bubalinos, demonstrando a localização da região de amplificação pelos respectivos *primers* e sítios de corte das enzimas.

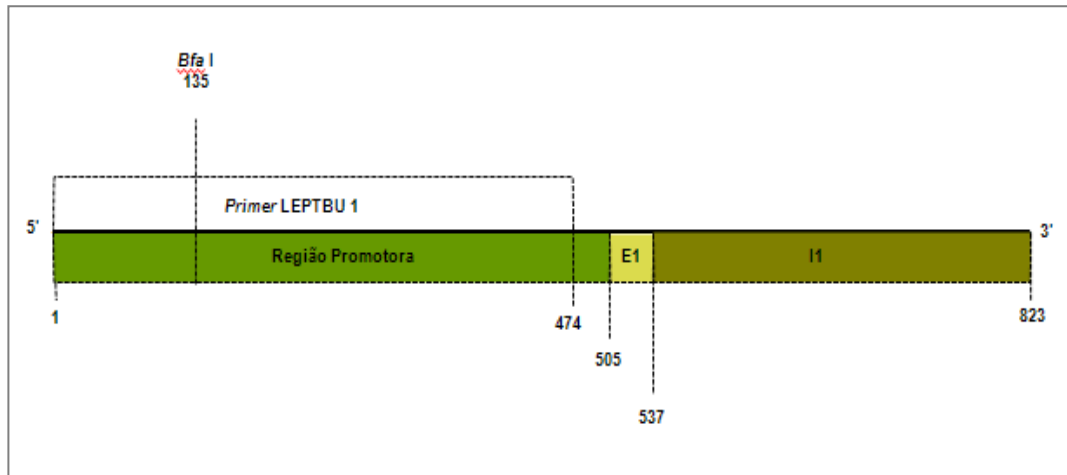


Figura 1. Mapa genético da sequência nucleotídica do gene da leptina bubalina (*Genbank access number* AY495586) com a posição do *primer* LEPTBU1 e o sítio da enzima de restrição *Bfa*I (E1 = exon 1, I1 = íntron 1).

Fonte: Elaborada pelos autores.

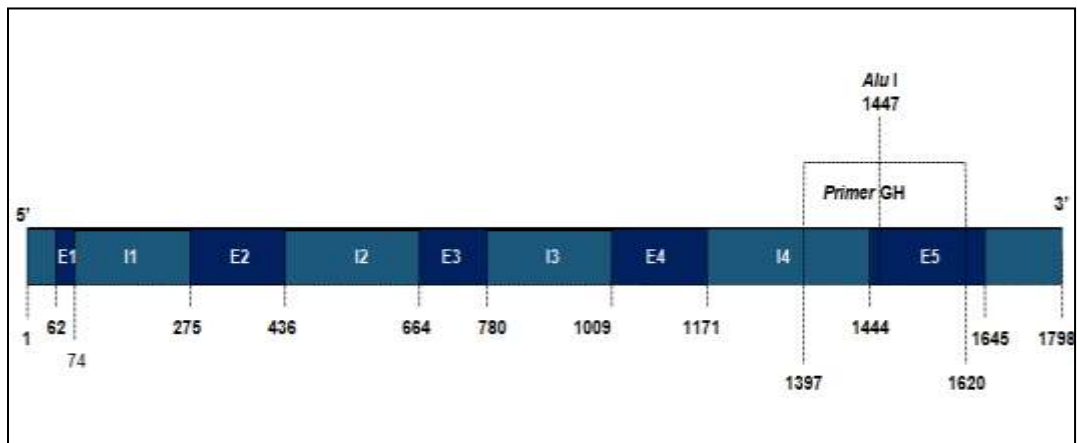


Figura 2. Mapa genético da sequência nucleotídica do hormônio do crescimento bubalino (*Genbank access number* AJ011533) com a posição do *primer* GH e o sítio da enzima de restrição *Alu*I (E1 = exon 1, I1 = íntron 1, E2 = exon 2, I2 = íntron 2, E3 = exon 3, I3 = íntron 3, E4 = exon 4, I4 = íntron 4 e E5 = exon 5).

Fonte: Elaborada pelos autores.

Determinação das frequências alélicas, genotípicas, erro padrão, heterozigidade e teste do χ^2 para equilíbrio de Hardy-Weinberg

As frequências alélicas e genotípicas foram estimadas por contagem simples dos alelos visualizados em gel de agarose. A frequência alélica p e q corresponde aos dois alelos a e b resultantes da análise RFLP. As frequências alélicas, genotípicas, erro padrão, heterozigidade e teste χ^2 ($p < 0,05$) para aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg foram estimados conforme procedimento descrito por Weier (1990), a partir das seguintes equações:

Frequência alélica (f):

$$p(A) = \frac{2N_{AA} + N_{AB}}{2N}$$

$$p(B) = \frac{2N_{BB} + N_{AB}}{2N}$$

a) Erro padrão da frequência alélica (EP)

$$EPp = EPq = \sqrt{\frac{pi(1-pi)}{2N}}$$

b) Frequência genotípica (F)

$$F(AA) = \frac{N_{AA}}{2N}$$

$$F(AB) = \frac{N_{AB}}{2N}$$

$$F(BB) = \frac{N_{BB}}{2N}$$

c) Heterozigosidade (H)

$$H = 1 - \sum F_{oii}$$

d) Heterozigosidade esperada (He)

$$H = 1 - \sum pi^2$$

e) Teste χ^2 para equilíbrio de Hardy-Weinberg

$$\chi^2 = \sum \left[\frac{(n_{oij} - n_{eij})^2}{n_{oij}} \right]$$

Sendo que:

N_{AA} = Número de animais de genótipo AA

N_{BB} = Número de animais de genótipo BB

N_{AB} = Número de animais de genótipo AB

N = Número de animais da amostra

$p(A)$ = Frequência do alelo A

$q(B)$ = Frequência do alelo B

pi = Frequência do alelo i

F_{oii} = Frequência observada do homocigoto ii

n_{oi} = Número de animais observados da classe genotípica ii

n_{ei} = Número esperado de animais da classe genotípica ii

Resultados e discussão

Extração de DNA

O protocolo utilizado para a extração de DNA mostrou-se eficiente, rápido e de fácil execução. O DNA extraído foi visualizado em gel de agarose a 1% (Figura 3), não sendo necessária a realização de tratamentos subsequentes para purificação das amostras de DNA obtidas.

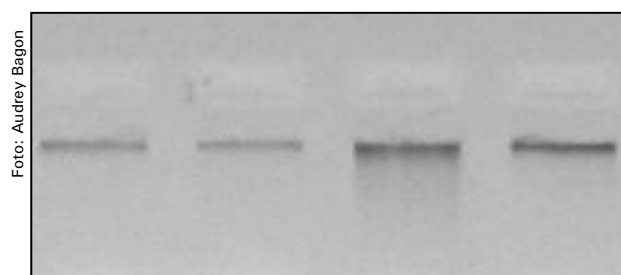


Figura 3. Amostras 1, 2, 3 e 4 de DNA genômico total extraído de sangue bubalino em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

Amplificação por PCR, análise RFLP e frequências alélicas para os genes da Leptina e GH

Gene da Leptina

O *primer* LEPTBU 1 amplificou uma banda bem definida de 474 pb e as análises de RFLP-PCR realizadas com a enzima *Bfa*I, resultaram em 3 padrões de digestão (Figura 4). O primeiro, contendo o fragmento não digerido de 474pb, correspondente ao homocigoto W/W. O segundo apresentou um fragmento não digerido de 474pb e dois outros fragmentos de 339pb e 135pb, correspondente ao heterocigoto W/P, e o terceiro padrão exibiu apenas os fragmentos de 339pb e 135pb correspondente ao homocigoto P/P.

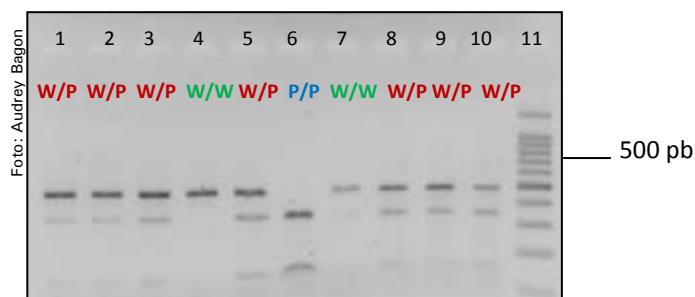


Figura 4. Padrões de RFLP-PCR do gene da leptina bubalina realizado com a endonuclease de restrição *Bfa* I, onde, poço (1), heterocigoto WP; poço (2), heterocigoto WP; poço (3): heterocigoto WP; poço (4) homocigoto WW; poço (5) heterocigoto WP; poço (6) homocigoto PP; poço (7) homocigoto WW; poço (8) heterocigoto WP; poço (9) heterocigoto WP; poço (10) heterocigoto WP; poço (11) marcador de pares 100 pares de base.

Gene GH

A reação de amplificação do fragmento do gene GH bubalino, resultou em um *amplicon* de 223 pb com mesmo padrão de migração relatado por Shi et al. (2012), Jesus e Ramos (2008) e Mitra et al. (1995).

O resultado da digestão do fragmento amplificado com a enzima *Alu* I gerou os fragmentos de 223, 171 e 52 pb correspondentes ao genótipo heterozigoto W/P. A banda com 52 pb não era visível claramente no gel de agarose por conter menos de 100 pb. Outro genótipo encontrado foi o W/W denominado homozigoto polimórfico, pois as duas fitas de DNA apresentaram sítio de restrição para a enzima *Alu* I. A ausência do genótipo homozigoto P/P deste estudo, provavelmente se explica pelo número limitado de animais. Tiwari e Garg (1998) demonstraram que o genótipo heterozigoto W/P desse gene corresponde à Leucina/Valina. O genótipo homozigoto W/W resulta nos aminoácidos Leucina/Leucina e o homozigoto P/P representa Valina/Valina.

Os resultados encontrados neste trabalho coincidem com os obtidos por Jesus e Ramos (2008) e Tiwari e Garg (1998), indicando a mesma ocorrência do sítio reconhecido pela enzima *Alu* I, porém não estão em concordância com o verificado por Otaviano et al. (2004) e Mitra et al. (1995), onde os autores identificaram a ocorrência somente do genótipo W/W.

A Figura 5 mostra o padrão de bandas obtido após a digestão enzimática com a endonuclease de restrição *Alu* I.

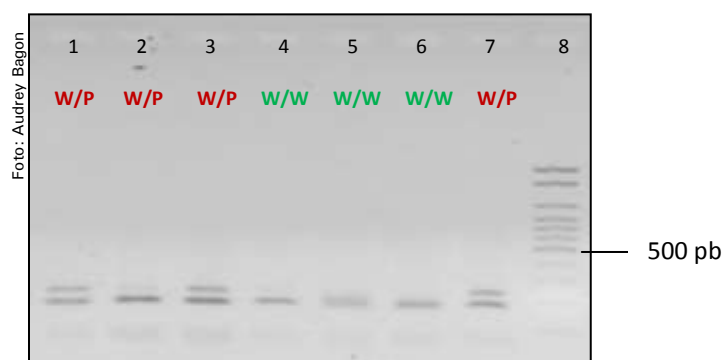


Figura 5. Padrões de RFLP-PCR do gene GH bubalino realizado com a endonuclease de restrição *Alu* I, onde: poço (1) heterozigoto WP; poço (2) heterozigoto WP; poço (3) homozigoto WW; poço (4) homozigoto WW; poço (5) homozigoto WW; poço (6) homozigoto WW; poço (7) heterozigoto WP; poço (8) marcador de 100 pares de base.

As frequências genotípicas e alélicas correspondentes à análise dos polimorfismos tipo RFLP observados para o gene da leptina e para o gene GH foram estimadas e estão apresentadas na Tabelas 5. Os valores de Qui-quadrado (X^2) calculados para cada grupo bubalino avaliado são apresentados na Tabela 6.

Tabela 5. Frequências genótípicas e alélicas observadas nos rebanhos bubalinos avaliados.

Polimorfismo	Frequência genotípica (%)									Rondônia - Frequência alélica (%)					
	Buf1Med			Buf2Med			Buf2BA			Buf1Med		Buf2Med		Buf2BA	
Leptina/Bfa I	WW (n = 19)	WP (n = 30)	PP (n = 2)	WW (n = 18)	WP (n = 21)	PP (n = 1)	WW (n = 27)	WP (n = 7)	PP (n = 3)	W	P	W	P	W	P
	37,26	58,82	3,92	45	52,5	2,5	72,97	18,92	8,11	66,67	33,33	71,25	28,75	82,43	17,57
GH/Alu I	WW (n = 2)		WP (n = 25)		WW (n = 7)		WP (n = 23)			W	P	W	P		
	7,41		92,59		23,33		76,67			53,7	46,3	61,67	38,33		

n = número de animais

Fonte: Elaborada pelos autores.

Tabela 6. Valores de Qui-quadrado (χ^2) calculados para cada grupo bubalino avaliado.

Grupo de animais	Teste χ^2	
	Gene da leptina	Gene GH
Buf1Med	0,25	0,37
Buf2Med	0,37	0,38
BufBA	0,41	-

Fonte: Elaborada pelos autores.

A diferença não foi significativa ($P > 0,05$) entre os valores do X^2 calculados para cada um dos grupos experimentais e o valor de X^2 tabelado, concluindo-se que as populações estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg para o polimorfismo no gene da leptina. A ausência do genótipo homocigoto P/P deste estudo, demonstrou que para o polimorfismo no gene GH, as populações não estavam em equilíbrio genético.

Na maior parte dos animais pertencentes ao grupo Buf1Med e Buf2Med observaram-se genótipos heterocigotos para os fragmentos digeridos nos genes da leptina e do GH, conforme foi apresentado na Tabela 5.

Para os genótipos das amostras provenientes dos bubalinos estabelecidos na Bahia, observa-se a presença de 72,97% animais homocigotos (W/W). O aumento da proporção de homocigose representa baixa diversidade na população, o que pode vir a ser um problema para a manutenção do rebanho, uma vez que a consanguinidade parece ser elevada.

Em estudos de caracterização de polimorfismos genotípicos, a seleção dos animais a serem genotipados e o tamanho amostral são questões importantes, uma vez que o número de indivíduos é influenciado pela frequência do polimorfismo na população (TRAINA et al., 2010). Outros estudos relacionados à seleção de matrizes bubalinas superiores assistidas por marcadores moleculares devem ser realizados a partir destes resultados para tentar associar esses polimorfismos com características de interesse econômico em rebanhos bubalinos, onde espera-se identificar os melhores genótipos bubalinos para produção de carne e leite, os quais serão disponibilizados aos produtores por meio da oferta de sêmen e embriões provenientes de bubalinos genotipados para caracteres de interesse pecuário.

Conclusões

1. A utilização da técnica de RFLP-PCR com as enzimas *Bfal* e *AluI* demonstrou-se eficiente na genotipagem dos animais, podendo ser aplicada em estudos de associação com características de interesse econômico em bubalinos.
2. Detectou-se a presença de polimorfismos para ambos os genes nos grupos bubalinos estudados.
3. Para o gene *LEPTINA*, os alelos W e P não apresentaram frequências muito próximas, e o genótipo prevalente na população foi o heterocigoto LEP^{WW} .
4. Não foi detectado o genótipo GH^{PP} (Valina/Valina) na população estudada^A.
5. Nas populações avaliadas, a distribuição genotípica estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg apenas para o polimorfismo no gene da leptina.

Referências

ALBUQUERQUE, M. S. M.; EGITO, A. A.; MARQUES, J. R. F.; CIAMP, A. Y.; MARIANTE, A. S.; COSTA, M. R.; CASTRO, S. T. R.; PAIVA, S. R.; CONTEL, E. P. B.; SILVA, A. C. M. E. Variabilidade genética em búfalos determinada por marcadores RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n.4, p.623-628, 2005.

ANDREA, M. V.; GOMES, M. V. M.; MARCONDES, C. R.; OLIVEIRA, K. N.; RAMOS, E. S.; FONTELES, S. B. Relação entre polimorfismo do gene do hormônio do crescimento e características de precocidade em novilhas da raça Nelore. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.63, n.1, p.153-157, 2011.

ANDRIGHETTO, C.; JORGE, A. M.; ROÇA, R. O. RODRIGUES, E; BIANCHINI, W; FRANCISCO, C. L Características físico-químicas e sensoriais da carne de bubalinos Murrah abatidos em diferentes períodos de confinamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v.37, n.12, p.2179-2184, 2008.

BARBOSA, S. B. P.; LOPES, C. R. A.; PEREIRA, R. G. A. **Environmental and inherited factors as sources of variaton in buffalo birth weight**. In: WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION, 8., 2006, Belo Horizonte. Proceedings... Belo Horizonte: UFMG, 2006. (CD-ROM).

BERNARDES, O. Bubalinocultura no Brasil: situação e importância econômica. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.31, n.3, p.293-298, 2007.

BRITO, L. G.; OLIVEIRA, M. C. de S.; MOURA, M. M. da F.; SILVA NETTO, F. G. da S.; CAVALCANTE, F. A.; MARIM, A. D.; SOUZA, G. C. R. de; SILVA, J. L. da. **Extração de DNA a partir de coágulos sanguíneos bovinos**. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2006. 17 p. (Embrapa Rondônia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 43).

CHILLIARD, Y.; FERLAY, A.; DELAVALD, C.; BOCQUIER, F. Plasmaleptin in underfed or overfed adult Holstein and Charolais cows, and its relationship with adipose tissue cellularity. **International Journal Of Obesity**, Londres, v. 22, p. 171-174, 1998.

CHILLIARD, Y.; BONNET, M.; DELAVALD, C. et al. Leptin in ruminants. Gene expression in adipose tissue and mammary gland, and regulation of plasma concentration. **Domestic Animal Endocrinology**, Stoneham, v. 21, p. 271-295, 2001.

DEL LAMA, S. N.; ZAGO, M. A. Identification of the k-casein and B-lactoglobulin genotypes in Brazilian *Bos indicus* and *Bubalus bubalis* populations. **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v.19, n.1, p.73-77, 1996.

SUMÁRIO nacional de touros das raças zebuínas: Nelore, 2009/2010. Disponível em: <http://www.cnpqg.embrapa.br/~locs/sumario/sumario_zebu.htm>. Acesso em: 29 mar. 2010.

FONSECA, W. **O búfalo**: sinônimo de carne, leite, manteiga e trabalho. 4. ed. São Paulo: ÍCONE, 1986. 84p.

GARCIA, M. R.; AMSTALDEN, M.; WILLIAMS, S. W.; STANKO, R. L.; MORRISON, C. D.; KEISLER, D. H.; NIZIELSKI, S. E.; WILLIAMS, G. L. Serum leptin and its adipose gene expression during pubertal development, the estrous cycle, and different seasons in cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 80, n. 8, p. 2158-67, 2002.

GE, W.; DAVIS, M. E.; HINES, H. C.; IRVIN, K. M.; SIMMEN, C. M. Association of single nucleotide polymorphisms in the growth hormone and growth hormone receptor genes with serum insulin-like growth factor I concentration and growth traits in Angus cattle. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 81, n.3, 641-648, 2003.

IBGE. **Pesquisa Pecuária Municipal – PPM**, 2010. [2010]. Disponível em: < http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2010/tabelas_pdf/tab11.pdf >. Acesso em: 22 set. 2013.

JESUS, A. P. R.; RAMOS, P. R. R. Polimorfismos no éxon V do gene do hormônio de crescimento de búfalas (*Bubalus bubalis*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA, 18.; CONGRESSO INTERNACIONAL DE ZOOTECNIA, 10., 2008, João Pessoa. **Anais...** João Pessoa: UFPB: ABZ, 2008. ZOOTEC.

LARA, M. A. C. **Variabilidade genética em bovinos e bubalinos através de polimorfismos protéicos**: análise populacional e suas implicações no melhoramento. 1998. 215p. Tese (Doutorado) - Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

LÔBO, R. B.; BEZERRA, L. A. F.; VOZZI, P. A.; MAGNABOSCO, C. U.; ALBUQUERQUE, L. G.; SAINZ, R. D.; BERGMANN, J. A. G.; FARIA, C. U.; OLIVEIRA, H. N. **Avaliação genética de touros das raças Nelore, Guzerá, Brahman e Tabapuã**: Sumário 2010. Ribeirão Preto: ANCP, 2010. 172 p.

LUSH, J. L. **Animal breeding plans**. 3. ed. Ames: Iowa State College Press, 1945. 443 p.

MARQUES, J. R. F.; CAMARÃO, A. P.; MARTINEZ, G. B. **Criação de búfalos**. Brasília: Embrapa-SPI; Belém: Embrapa-CPATU, 1998. 141p. (Coleção Criar, 5).

MACEDO, M. P.; SOUZA, J. C.; RAMOS, A. A.; WECHSLER, F. S.; KAWATOKO, M.; CAMARGO, D. F. V.; MATTOS, J. C. A. Efeitos ambientais e genéticos sobre o peso aos 210 dias de bezerros bubalinos da raça Mediterrânea. In: SIMPOSIO SOBRE PASTAGENS NOS ECOSSISTEMAS BRASILEIROS; REUNIAO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 32., 1995, Brasília, DF. **Pesquisas para o desenvolvimento sustentável**: anais. Brasília: SBZ, 1995. 200p. il. p.723-724.

MALHADO, C. H. M.; RAMOS, A. A.; CARNEIRO, P. L. S. Parâmetros e tendências da produção de leite em bubalinos da raça Murrah no Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v.36, n.2, p.376-379, 2007.

MIRANDA, W.C. **A criação de búfalos no Brasil**. São Paulo: Editora dos Criadores, 1986. 173p. il.

MITRA, A.; SCHLEE, P.; BALAKRISHNAN, C. R.; PIRCHNER, R. Polymorphisms at growth-hormone and prolactin loci in Indian cattle and buffalo. **Journal of Animal Breeding and Genetics, Berlin**, v. 112, n. 1/6, p. 71-74, dez. 1995.

MOITA, A.K.F.; LOPES, P.S.; TORRES, R.A.; Euclides, R. F.; Tonhati, H.; Freitas, A.F. Heterogeneidade de variâncias na avaliação genética de búfalas no Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v.39, n.7, p.1443-1449, 2010.

OTAVIANO, A. R.; MARCHIORI, K. S.; SENNA, J. A. D.; LEMOS, M. V. F.; FERRAZ, A. L.; TONHATI, H. Estudo do V exon do gene do hormônio de crescimento de búfalo *Bubalus bubalis* por reação de cadeia de polimerase - polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição (PCR-RFLP). SIMPÓSIO NACIONAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MELHORAMENTO ANIMAL, 5., 2004, Pirassununga. **Anais...** Pirassununga: Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal, 2004.

RAMOS, A. de A.; WECHSLER, F. S.; ONSELEN, V. J. van; GONCALVES, H. C. **PROMEBUL** : sumário de touros bubalinos. Botucatu: UNESP, 2004. 39 p. il.

SENA, L.; SCHNEIDER, M. P.; BRENING, B.; HONEYCUT, R. L.; WOMACK, J. E.; SKOW, L. C. Polymorphisms in MHC-DRA and DRB alleles of water buffalo (*Bubalus bubalis*) reveal different features from cattle DR alleles. **Animal Genetics**, Oxford, v.34, p.1-10, 2003.

SENO, L. O.; CARDOSO, V. L.; TONHATI, H. Responses to selection for milk traits in dairy buffaloes. **Genetic Molecular Research**, v.5, n.4, p.790-796, 2006.

SHI, D. S.; WANG, J., YANG, Y.; LU, F. H.; LI, X. P.; LIU, Q. Y. DGAT1, GH, GHR, PRL and PRLR Polymorphism in Water Buffalo (*Bubalus bubalis*). **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 47, n.2, p. 328-334, 2012.

TIWARI G.; GARG L. C. **Cloning and characterization of growth hormone encoding gene in Bubalus bubalis**. [1998]. Disponível em: < http://www.EMBL/GenBank/DDBJ_databases >. Acesso em: 10 jun. 2012.

TONHATI, H.; DUARTE J. M. C.; MUÑOZ, M. F. C.; OLIVEIRA, J. A. de; MACHADO, D. F. B.; OLIVEIRA, J. F. S. de. Parâmetros Genéticos para a Produção de Leite em Bubalinos no Estado de São Paulo. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 36., 1999, Porto Alegre, RS. **Anais...** Barueri: Videolar, 1999. v. 1, p. 151-3p. Disponível em: <<http://www.sbz.org.br>>. Acesso em: 10 set. 2013.

TONHATI, H.; MENDOZA-SÁNCHEZ, G.; SESANA, R. Programa de melhoramento genético de búfalos lecheros en el Brasil. In: SIMPOSIO DE BÚFALOS EUROPA-AMÉRICA, 2., 2006, Medellín, Colômbia. **Palestras....** Medellín: [s.n.], 2006. p.123-130.

TONHATI, H.; VASCONCELLOS, B.F.; WALDIGE, V. Sazonalidade de partos, repetibilidade e fatores que afetam a produção de leite e a duração da lactação em búfalos da raça Jafarabadi. **Veterinária Notícias**, Uberlândia, v.4, n.1, p.89-95, 1998.

TRAINA, E.; DAHER, S.; FRANCHIM, C. S.; FUZIY J. A.; MORON, A. F.; BANZATO, P. C. A.; MATTAR, R. Polimorfismo do gene dos receptores de progesterona e o aborto espontâneo de repetição. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 5, p.229-33, 2010.

VASCONCELLOS, B. F.; TONHATI, H. Inbreeding and its effects on some productive and reproductive traits in a Murrah buffalo herd. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, Berlin, v.115, p.299-306, 1998.

WEIER, B. S. **Genetic Data Analysis: Methods for Discrete Population Genetic Data**. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 1990. 377 p.

ZADWORNÝ, D.; KUHLEIN, U. The identification of the kappa-casein genotype in Holstein dairy cattle using the polymerase chain reaction. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 80, p. 631-634, 1990.

Embrapa

Rondônia