
EFICIÊNCIA DE AMPLIFICAÇÃO DO DNA ISOLADO NO SANGUE BOVINO*

ALEX SILVA DA CRUZ, **DANILO CONRADO SILVA**, EMILIA OLIVEIRA A. COSTA, **CLÁUDIO CARLOS DA SILVA**, APARECIDO DIVINO DA CRUZ

Resumo: a extração de DNA oferece uma união de técnicas e experiências, enriquecendo assim o gado nacional. Testes genéticos são variáveis importantes para o sucesso das atividades rurais relacionadas com a melhoria do rebanho. O objetivo deste estudo foi avaliar a qualidade do DNA bovino isolado do sangue periférico por amplificação do DNA genômico por PCR.

Palavras-chave: Extração. Bovinos. Amplificação. PCR.

Apecuária nacional no Brasil está cada vez mais se intensificando. Novas técnicas vêm surgindo e antigas práticas estão sendo melhoradas a fim de maximizar a produção, conseqüentemente resultando em maiores lucros. (ANUALPEC. 2004 – IBGE. 2004).

A extração de DNA de boa qualidade é um passo crucial para o desenvolvimento de qualquer técnica de análise direta da molécula de ácido dextrorribonucléico, seja para sequenciamento, restrição, enzimática, ou amplificação via PCR, podendo assim, ser útil para surgimento de uma metodologia de mais eficientes para a exploração da genética bovina (LEVI *et al.*, 2003).

Apesar da diversidade de métodos para extração de DNA do sangue de bovinos, persiste o desacordo entre os especialistas acerca da recomendação da técnica apropriada, sobretudo considerando-se o fato de não existir uma extração específica para bovinos (LOPES *et al.*, 2001).

Neste sentido, a extração de DNA de qualidade de bovinos exige uma abordagem interdisciplinar proporcionando uma comunhão de técnicas e experiências, sendo assim, enriquecendo a pecuária nacional. O estudo genético é uma variável importante para o sucesso da atividade rural relacionada ao melhoramento do rebanho (MARTINHAGO *et al.*, 2006).

A biologia molecular tem criado ferramentas para pesquisa, tanto na medicina humana como na medicina veterinária. A reação em cadeia da polimerase (PCR) possibilita testes altamente sensíveis, cujas aplicações vão desde o diagnóstico clínico até os programas de melhoramento animal. Contudo, tais procedimentos dependem da habilidade de se extrair DNA em quantidade suficiente e de boa qualidade. Há vários métodos de purificação do DNA genômico, no entanto, ainda persistem problemas como contaminação por DNA estranho, inibidores de PCR e sensibilidade da molécula de DNA, que facilitam sua quebra (COELHO *et al.*, 2004).

Desenvolvida por Kary Mullis na década de 80 (MULLIS, 1983), a PCR é hoje uma das técnicas mais comumente utilizadas em laboratórios de pesquisas biológicas e de diagnóstico médico humano e veterinário. A PCR tornou-se uma ferramenta útil no processo de diversas tarefas biológicas, como o sequenciamento de genes e diagnóstico de doenças hereditárias, identificação de sexo genético, detecção de diagnóstico de doenças infecto-contagiosas e desenvolvimento de organismos transgênicos, para citar algumas das suas aplicações e versatilidade (BOUSQUET *et al.*, 1999).

As técnicas de extração e quantificação de DNA para utilização na reação em cadeia pela polimerase (PCR) permitem a investigação em diferentes amostras biológicas, mesmo quando o DNA esta presente em pequenas quantidades. Resquícius de saliva, esfregaço bucal, sangue, bulbos capilares, tecidos incluídos em parafina, ossos, plasma sanguíneo, gotas de esperma, entre outros, podem fornecer informações importantes, desde que analisados de forma adequada (BAREA *et al.*, 2004).

A PCR produz uma quantidade apreciável de um segmento específico de DNA, amplificado a partir de uma quantidade mínima de DNA genômico. A sequência molde é copiada *in vitro*, num processo mediado pela enzima *Taq* DNA-polimerase, obtendo-se milhões de cópias do fragmento de DNA de interesse (CARRAPA *et al.*, 2005).

Realizando a PCR na amplificação de DNA envolvendo a utilização de uma sequência de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*), direcionados para a amplificação de uma sequência autossômica bovina (controle interno da reação) caracterizando, dessa forma, a multiplex-PCR. Com a utilização desse sistema foram relatadas excelentes taxas de eficiência e de acurácia (93-98%) (SHEA, 1999).

A implementação de uma metodologia simples e precisa para extração e quantificação de DNA fetal em bovinos é importante para a otimização do manejo reprodutivo em programas de seleção e melhoramento (CARVALHAIS *et al.*, 2005).

O bovino pode ser considerado como uma “entidade”, ou seja, além de produtor de alimentos, possui sentimentos como o medo, angústia, sofrimento, ansiedade, pânico, os quais devem ser considerados dentro dos sistemas de produção (PARANHOS DA COSTA, 2000). A colheita de sangue nos bovinos é uma prática pouco estressante, comparada a outros manejos como ultrassonografia, inseminação artificial, transferência de embriões (VOISINET *et al.*, 1997), a qual pode provocar aos animais excitação e medo que altera o temperamento, resultando em percas produtivas.

Alterações de temperamento provocadas por manejos estressante, dentro do sistema de produção levam os animais a responder com alterações de comportamento, como: comendo com menor frequência, ingerindo menos quantidade de matéria seca, quando são mais agitados, não se adaptam facilmente a novas situações, são mais difíceis de manejar, apresentam maiores riscos de acidentes com os trabalhadores e perdas produtivas (GRANDIN, 2006).

O Brasil tem o maior rebanho bovino do mundo. São 195,5 milhões de cabeças de gado, segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2008), mais do que a população humana, de 182 milhões de pessoas. A produção anual é de 7,68

milhões de toneladas de carne. A produção de conhecimento científico para o processo de extração de DNA bovino é importante para o uso rotineiro de técnicas laboratoriais, e na contribuição para o desenvolvimento tecnológico da pecuária nacional.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a qualidade de DNA bovino isolado de sangue periférico mediante amplificação de DNA genômico por PCR.

MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi realizado com um grupo de bovinos, sendo que o grupo controle era constituído de um touro e o grupo de estudo, por 13 fêmeas. Os animais não apresentavam durante a coleta das amostras sanguíneas sintomas de doenças e não estavam em uso de medicamentos. As amostras de sangue periférico foram coletadas por punção venosa com seringas descartáveis heparinizadas. Durante o transporte, as amostras foram colocadas em uma caixa de isopor, contendo gelo, evitando-se drásticas variações de temperatura.

O DNA genômico foi purificado a partir de 300 µL de sangue total utilizando-se um kit comercial de extração de DNA (WIZARD®, Promega Corporation, EUA), de acordo com as instruções sugeridas pelo fabricante. A concentração de DNA (ng/µL) existente em cada amostra foi quantificada por espectrofotometria (GeneQuant™ Amersham Biociences, EUA).

Para a PCR, foi utilizado um par de primers Y-específico, de acordo com a sequência a seguir: 5' -ATC AGT GCA GGG ACC GAG ATG - 3' e 5' -AAG CAG CCG ATA AAC ACT CCT T - 3', que detecta um fragmento de 196pb, indicando apenas a presença do cromossomo Y nas amostras extraídas de plasma materno.

Para a PCR, foram usados os conjuntos de primers (oligonucleotídeos iniciadores) descritos por Resende e colaboradores (2008) e amplificadas no termociclador Swift Maxi Gradient Thermal Cycler (ESCO® EUA). A PCR foi preparada para um volume final de 25,0µL, contendo 10,0µL de DNA bovino, 0,150pmoles de cada conjunto de primers, 5,0µL de tampão de PCR Gold STR® (Promega Corporation, EUA), 50mM de cloreto de magnésio e 0,5 µL de Taq DNA polimerase (5U/ µL).

Tabela 1: Protocolo de termociclagem para amplificação de DNA bovino

Parâmetros	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Total de ciclos
Desnaturação inicial	94	5	1
Desnaturação	94	1	
Anelamento	58°	0,5	38
Extensão	72	1	
Extensão final	72	7	1
Armazenamento	4	∞	-

Para a determinação da qualidade do material extraído amplificado pela PCR, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 2% a 10 volts por centímetro de gel. Além das amostras, um marcador molecular de 100 pares de bases (pb) também foi submetido à corrida eletroforética.

Complementando este estudo, foi realizada análises hematológicas de 25% do grupo amostral, definidas ao acaso (H1, H2 e H3), para contagem de células brancas (CB), hemoglobina (HE), proteína bruta (PB) e albumina (AL) Este procedimento foi adotado para a verificação de possíveis inibidores para extração e ou PCR. Para o cálculo estatístico, foi utilizado o programa Excel® 2007 (Microsoft Corporation, EUA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram analisadas 12 amostras de sangue periférico bovino submetidas a extração de DNA pelo Kit comercial WIZARD® e amplificadas por PCR. Deve-se levar em conta nesse resultado, primeiramente o fato de os animais serem aparentemente saudáveis, não manifestando sinais clínicos característicos. Adicionalmente, todas as amostras de DNA foram quantificadas em espectrofotômetro e todas apresentaram DNA extraído, conforme Tabela 2 apresentado um desvio padrão de 29.93 ng/ µL.

Tabela 2: Resultados da quantificação espectrofotométrica de DNA genômico total isolado de sangue periférico bovino, utilizando-se *kit* comercial WIZARD®.

ANIMAIS	WIZARD	ANÁLISES HEMATOLÓGICA
1	5.8 ng/ μ L	
2	39.6 ng/ μ L	
3	87.5 ng/ μ L	
4	8.1ng/ μ L	
5	6.3 ng/ μ L	
Continua..		
6	66.5 ng/ μ L	
7 H2	10.2 ng/ μ L	HE 11.2, PB 8.0
8	6.4 ng/ μ L	
9 H1	4.3 ng/ μ L	HE 13.8, PB 8.8
10	69.4 ng/ μ L	
11 H3	30.1 ng/ μ L	HE 9.8, PB, 7.7
12	13.6 ng/ μ L	
MÉDIA (DP)	31.6 (29.93) ng/ μ L	

Legenda: DP = Desvio padrão; CB células brancas, HE hemoglobina, PB proteína bruta e AL albumina.

A extração e isolamento de DNA usando o kit WIZARD®, embora considerado robusto para obter DNA de sangue periférico e outros tecidos biológicos, no presente estudo não foi capaz de produzir DNA de sangue periférico bovino com baixa variação demonstrado pelo alto desvio padrão (tabela 2). Contudo a extração do DNA obteve qualidade satisfatória para ser amplificado por PCR (figura 1), entretanto na amostra 9 não foi possível identificar a presença de amplicon. Esta amostra apresentou a menor quantificação (4.3 ng/ μ L), podendo ser atribuído o fato a contaminantes protéicos isolado concomitantemente com o DNA funcionam como um potente inibidor da reação de PCR.

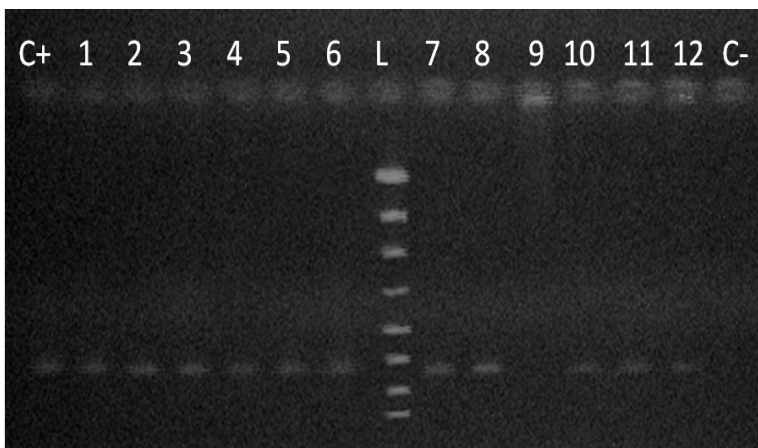


Figura 1: Amplicons de genoma bovino gerados por PCR a partir de DNA isolado de sangue periférico

Legenda: L = marcador de peso molecular de 100 pares de base; 1 a 12 = animais doadores de sangue periférico; C- = controle negativo; C+ = controle positivo de amplificação. Tamanho do amplicon esperado foi de 280pb.

O método utiliza uma Proteinase inespecífica, onde os resultados da PCR podem ser atribuídos a esta etapa, visto que os contaminantes protéicos contidos nos produtos isolados são a principal causa de inibição da DNA polimerize *in vitro* (CARRAPA *et al.*, 2005). Assim, o uso de uma protease de largo espectro contribuiu para a obtenção de DNA de qualidade. Considerando-se que no sangue bovino a concentração de proteína é elevada, sugerimos que ao se isolar DNA de plasma deve se incorporar um passo de digestão proteolítica com uma enzima de largo espectro.

A PCR é um método extremamente poderoso na amplificação de baixas concentrações de DNA. Como o princípio da reação está no conhecimento da sequência do DNA alvo e em reação bioquímica complexa (González-Andrade, 2008), permitindo a amplificação seletiva, *in vitro*, de sequências específicas do DNA alvo que se deseja estudar. A identificação dos fragmentos amplificados foi realizada após eletroforese convencional, seguida pela detecção de amplificação. Esta, não esta presente na amostra 9 (Figura1). contudo a existência de um arraste mediante a eletroforese desse material pode indicar a degradação excessiva de DNA, sendo essa argumentação aparada pela quantificação da amostra de 4.3 ng/ μL , indicando a presença do DNA. Entretanto, por se tratar

de uma amostra com sangue periférico, é necessário salientar outros possíveis inibidores de PCR, em estudo com humanos, a hemoglobina pode inibir a reação, já que os íons Fe^{++} são competidores dos íons Mg^{++} , necessários à ação da DNA polimerase. Tais inibidores parecem não ser destruídos por proteinases, não solúveis em solventes orgânicos e possuem um peso molecular menor que 10 quilodáltons (AN & FLEMING, 1991).

Na amostra 9H1 a análise hematológica (Tabela 1) revelou uma presença de hemoglobina de 13.8 gm/dL, este valor elevado em relação aos níveis referenciais para bovinos de 10 a 12 gm/dL, (REPETTI *et al.* 2008) e 29% maior que 11H3 (9.8 gm/dL) que possui uma quantificação de DNA de 30.1 ng/ μL próximo a média das amostras de 31.6 ng/ μL .

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos com este estudo demonstram que de fato que as amostras extraídas de DNA genômico WIZARD[®] de sangue periférico bovino possuem uma variação alta durante a quantificação apresentando um desvio padrão de 99.27 ng/ μL , porem há uma uniformidade na intensidade dos amplicons demonstrando que este extrator de DNA é eficaz na extração resultando em DNA de boa qualidade comprovada pela amplificação pela PCR.

Em apenas uma amostra a reação em cadeia da polimerase não foi capaz de amplificar o material extraído, contudo a baixa quantidade de DNA aliada à possibilidade de inibidores de reação como a proteína e hemoglobina afetaram a eficácia de PCR em produzir este amplicon.

De fato a extração utilizou uma protease inespecífica, diminuindo a probabilidade da presença do contaminante protéico que se isolado juntamente com o DNA funcionaria como um inibidor da reação de PCR.

Entretanto, a análise hematológica da amostra comparada com relatos de outras publicações, permitiu aos autores deste estudo, que a presença da hemoglobina inibe a PCR na amostra com baixa concentração de DNA.

Finalmente é permitido concluir que a utilização de uma protease inespecífica é importante para a purificação de DNA genômico de boa qualidade e a elevada presença de hemoglobina

pode inibir a reação em cadeia da polimerase. Nesse sentido a padronização de uma técnica de extração de DNA bovino é um fator muito importante para a execução de qualquer estudo sobre a molécula de DNA e o conhecimento dos possíveis inibidores de reação de PCR é importante para o surgimento de metodologias mais eficientes.

AMPLIFICATION EFFICIENCY OF DNA ISOLATED FROM BOVINE BLOOD

Abstract: the extraction of DNA provides a commonality of techniques and experiences, thus enriching the national livestock. Genetic testing is an important variable for success of rural activities related to improving the herd. The aim of this study was to evaluate the quality of bovine DNA isolated from peripheral blood by amplification of genomic DNA for PCR.

Keywords: Extraction. Cattle. PCR.

Referências

AN, S.F.; FLEMING, K.A. Removal of inhibitors of the polymerase chain reaction from formalin fixed, paraffin-wax embedded tissues. *Journal of Clinical Pathology*, v. 44, n. 11, p. 924-927, 1991.

BAREA, J. A.; PARDINI, M.I.; GUSHIKEN, T.Extração de DNA de materiais de arquivo e fontes escassas para utilização em reação de polimerização em cadeia (PCR). *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 26, n. 4, p. 274-281, 2004.

BOUSQUET, D. et al. In vitro embryo production in the cow: an effective alternative to the conventional embryo production approach. *Theriogenology*, v. 51, n. 59-70, 1999.

CARRAPA, A. et al. *Técnicas de análise de DNA aplicadas a diagnóstico*. Tese (Doutorado da Faculdade de Medicina - Universidade do Porto, 2005).

CARVALHAIS, I. et al. Implementação de um método simples e preciso para sexagem de embriões bovinos. In: 3º CONGRESSO DA SPCV. Resumo, São Paulo, 2005.

COELHO, E. G. A. et al. Comparação entre métodos de estocagem de DNA extraído de amostras de sangue, sêmen e pêlos e entre técnicas de extração. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, n. 56, v. 1, p. 111-115, 2004.

Grandin, T. Bruises and carcass damage. 2006. *International Journal for the Study of Animal Problems*. Disponível em: <<http://www.grandin.com>>. Acesso em: 15 nov. 2006.

GRIBBEN, J.G.; FREEDMAN, A.S.; WOO, S.D. All advanced stage non-

Hodgkin's lymphomas with a polymerase chain reaction amplifiable breakpoint of bcl-2 rearrangement at evaluation and after treatment. *Blood*, v. 78, n. 12, p. 3275 – 3280, 1991.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa da Pecuária Nacional. 2008. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em: 25 jan. 2009.

LEVI, J.E.; WENDEL, S.; TAKAOKA, D.T. Determinação pré-natal do sexo fetal por meio da análise de DNA no plasma materno. *Revista Brasileira de Ginecologia Obstetrícia*, v. 25, n. 9, p. 687-690, 2003.

MARTINHAGO, C.D. et al. Determinação precoce do sexo fetal pela análise do DNA no plasma materno. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, v. 28, p. 190-194, 2006.

PARANHOS DA COSTA, M. J. R. et al. Proceedings. In: 7TH WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION. Resumo, France, 2002.

REPETTI, E. et al. Valores Normais do Quadro Hematológico dos Animais Domésticos. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 32, n. 3, p. 23- 30, 2008.

RESENDE, M.V. et al. Falha na sexagem por inibição do desenvolvimento de embriões bovinos produzidos in vitro com anticorpos anti H-Y. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 60, n. 3, p. 594-599, 2008.

SHEA, B.F. Determining the sex of bovine embryos using polymerase chain reaction results: a six year retrospective study. *Theriogenology*, v. 51, p. 841-845, 1999.

VOISINET, B.D. et al. Cattle with calm temperaments have higher average daily gains than cattle with excitable temperaments. *Journal of Animal Science*, v. 75, p. 892-896, 1997.

* Recebido em: 01.08.2010
Aprovado em: 12.08.2010.

ALEX SILVA DA CRUZ

Zootecnista pela Pontifícia Universidade Católica de Goiás. Atualmente mestrando em Biologia Celular e Molecular pela Universidade Federal de Goiás.

DANILO CONRADO SILVA

Biólogo pela Pontifícia Universidade Católica de Goiás. Atualmente aluno de Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Goiás.

Emilia Oliveira Alves Costa: Bióloga e Mestre em Genética pela Pontifícia Universidade Católica de Goiás. Bolsista da Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN).

CLÁUDIO CARLOS DA SILVA

Doutor em Biologia Celular e Molecular pela Universidade Federal de Goiás. Professor assistente da PUC Goiás desde 2002.

APARECIDO DIVINO DA CRUZ

Biomédico pela UCG e concluiu o doutorado em Biologia Molecular pela University of Victoria - BC, Canadá em 1997. Atualmente é Professor Titular dos Departamentos de Biologia e de Medicina da Pontifícia Universidade Católica de Goiás e Biomédico Geneticista da Secretaria de Estado da Saúde de Goiás.