

Estudo da diversidade alélica do gene DRB3 em búfalos da raça Jafarabadi¹

Lucas Matheus Olivatto² Nedenia Bonvino Stafuzza³ Humberto Tonhati⁴ Maria Elisabete Jorge Amaral⁵

¹Parte do projeto de pesquisa de mestrado do autor, financiada pela CAPES

²Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento Animal - UNESP/Jaboticabal. Bolsista da CAPES. e-mail: lucasolivatto@hotmail.com

³Pós-doutoranda do Departamento de Biologia - IBILCE-UNESP/São José do Rio Preto. Bolsista da FAPESP. e-mail: nedeniabs@gmail.com

⁴Professor do Departamento de Zootecnia - FCAV/UNESP - Jaboticabal. e-mail: tonhati@fcav.unesp.br

⁵Professora do Departamento de Biologia - IBILCE-UNESP/São José do Rio Preto. e-mail: eamaral@ibilce.unesp.br

Resumo: O presente trabalho teve como objetivo avaliar a diversidade alélica do gene DRB3 em búfalos da raça Jafarabadi, por meio da técnica PCR-RFLP. Foram utilizadas amostras de DNA de 21 animais não relacionados, cujos produtos de PCR apresentaram um tamanho de 304 bp, de acordo com o descrito na literatura. Os produtos de PCR foram digeridos com a enzima de restrição *Hae III*, gerando dois padrões polimórficos - padrão 1 (222 e 82 bp) e padrão 2 (170 e 134 bp). O padrão polimórfico 2 foi o mais frequente, presente em 54,8% dos animais. O conhecimento de polimorfismos nas populações brasileiras de búfalo é imprescindível para auxiliar em questões relacionadas à variabilidade genética intra e inter-populacional, além de serem potencialmente úteis para o desenvolvimento de marcadores para serem utilizados em programas de melhoramento animal.

Palavras-chave: *Bubalus bubalis*, enzima de restrição, PCR-RFLP, polimorfismo

Allelic diversity study of the DRB3 gene in Jafarabadi buffaloes breed

Abstract: The present study has the purpose to evaluate the allelic diversity of the gene DRB3 in Jafarabadi buffaloes by PCR-RFLP. The PCR products showed a size of 304 bp, from 21 DNA samples of unrelated animals, in agreement with described in the literature. The digestion with the restriction enzyme *Hae III*, resulted in two polymorphic patterns – pattern 1 (222 e 82 bp) and pattern 2 (170 e 134 bp). The most frequent polymorphic pattern was the pattern 2, which was observed in 54,8% of the animals. To solve questions related to populational genetic variability is essential the knowledge of the polymorphism to the Brazilian buffaloes populations, which could be potentially useful for the development of markers for genetic improvement programs.

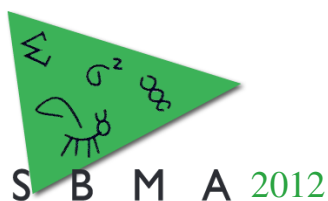
Keywords: *Bubalus bubalis*, PCR-RFLP, polymorphism, restriction enzyme

Introdução

O Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) é uma região do genoma com um denso agrupamento de genes que apresentam alto grau de polimorfismo, cuja maioria dos genes estão relacionados com a resposta imune inata e adaptativa, exercendo um papel importante na resposta do hospedeiro à patógenos. Entre os genes do MHC, os genes DRB são amplamente utilizados em estudos de polimorfismos. Esses genes codificam a cadeia β da molécula DR, cujos polimorfismos se concentram principalmente no segundo éxon, o qual é o responsável por codificar a porção variável do sítio de ligação peptídica da proteína (Amills et al., 1998). Tais genes têm chamado muito a atenção, se tratando de animais de produção, diante da necessidade de prover métodos mais eficientes no controle de doenças, por meio do desenvolvimento de vacinas e da seleção de animais resistentes.

O búfalo de rio (*Bubalus bubalis*) representa uma fonte crescente na pecuária devido suas vantagens produtivas e reprodutivas que elevam seu *status* econômico no cenário agropecuário brasileiro e mundial. Entre as 22 raças de búfalo de rio descritas, apenas três raças são encontradas no Brasil e reconhecidas pela Associação Brasileira dos Criadores de Búfalos: Murrah, Jafarabadi e Mediterrâneo (Moioli & Bhorguese, 2005).

Uma vez que os estudos da literatura relacionados com polimorfismos no gene DRB3 se limitam a animais da raça Murrah (Sumathi et al., 2010; Kumar et al., 2011), estudos que identifiquem polimorfismos



nesse gene em animais das demais raças de búfalo criadas no Brasil se faz necessário. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a diversidade alélica do gene DRB3 em 21 búfalos da raça Jafarabadi por meio da técnica de PCR-RFLP (do inglês *Polymerase Chain Reaction–Restriction Fragment Length Polymorphism*).

Material e Métodos

Foram utilizadas amostras de DNA extraídas de bulbo folicular, provenientes de 21 animais não relacionados da raça Jafarabadi, residentes em fazendas de Sales de Oliveira-SP e de Belém-PA. Para a amplificação do éxon 2 do gene DRB3 foram utilizados os iniciadores para PCR descritos por Siguardardottir et al. (1991). As reações de PCR foram realizadas em um termociclador Veriti® (*Life Technologies*), com um volume de 30 µL, contendo 50 ng de DNA genômico, 0,2 mM de cada um dos iniciadores para PCR, 100 mM de dNTP, 10 mM de Tris-HCl, 1,5 mM de MgCl₂, e 1U da DNA polimerase GoTaq® Hot Start (*Promega*). Os ciclos para amplificação foram os seguintes: 94°C por 2 minutos para desnaturação inicial, seguida de 35 ciclos com desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento dos iniciadores para PCR a 62°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 30 segundos e extensão final a 72°C por 7 minutos.

Verificada a amplificação por PCR, os produtos da reação de PCR foram submetidos à digestão pela enzima de restrição *HaeIII* (*Promega*) para detecção de polimorfismos. Para a análise por RFLP, 5 µl do produto de PCR foi submetido à digestão com 5U da enzima *HaeIII*, a qual ocorreu a 37°C por 16 horas. Os fragmentos digeridos foram visualizados em gel de agarose 4%, corado com brometo de etídio, submetido à eletroforese horizontal a 100 V durante 90 minutos, em tampão TBE 0,5X. A constituição genotípica dos indivíduos foi determinada, para cada loco, por meio da análise dos dados obtidos por meio da técnica de PCR-RFLP, verificando a presença dos diferentes alelos identificados por ordem crescente de tamanho devido à migração eletroforética.

Resultados e Discussão

As reações de PCR produziram um produto amplificado de 304 bp com o DNA bubalino, o mesmo tamanho descrito nos trabalhos realizados por Kumar et al. (2011) e Sumathi et al. (2010). Após a digestão com a enzima de restrição *Hae III*, foram observados dois padrões polimórficos: padrão polimórfico 1 (222, 82 bp) e padrão polimórfico 2 (170 e 134 bp). As frequências alélicas observadas foram de 42,8% para o padrão polimórfico 1 e 54,8%, para o padrão polimórfico 2. O produto de PCR não digerido (304 bp) apresentou uma frequência alélica de 2,4%.

Um estudo realizado por Sumathi et al. (2010) identificou quatro padrões polimórficos em búfalos da raça Murrah, sendo dois deles os mesmos encontrados no presente estudo com animais da raça Jafarabadi – padrão polimórfico 1 (222, 82 bp) e padrão polimórfico 2 (170 e 134 bp) e dois padrões polimórficos não identificados no presente estudo, nomeados pelos autores de padrão a (170, 82 e 52 bp) e padrão d (193, 82 e 29 bp).

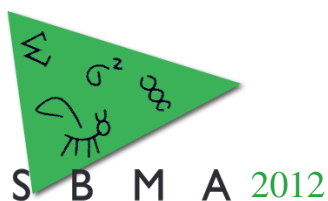
O padrão polimórfico 2 foi o mais frequente tanto nos animais da raça Jafarabadi utilizados no presente estudo (54,8%), quanto nos animais da raça Murrah avaliados por Sumathi et al. (2010), apresentando uma frequência de 63,9 % no referido trabalho.

Foram observadas quatro combinações diferentes entre os dois padrões polimórficos identificados e o produto de PCR não digerido, cujas frequências genotípicas e alélicas estão apresentadas na Tabela 1. Dos 21 animais analisados, 14 foram considerados homocigotos e sete heterocigotos. Entre os animais homocigotos, seis apresentaram homocigose para o padrão polimórfico 1 (222, 82 bp), oito para o padrão polimórfico 2 (170 e 134 bp). Entre os animais heterocigotos, seis apresentaram heterocigose para o padrões polimórficos 1 e 2, e um animal para o padrão polimórfico 2 e não digerido.

Tabela 1. Frequências genotípicas e alélicas dos padrões de PCR-RFLP do gene DRB3, detectados pela digestão com a enzima de restrição *Hae III* em búfalos da raça Jafarabadi

Frequências genotípicas (%)				Frequências Alélicas (%)		
nd/2	1/1	1/2	2/2	nd	1	2
4,7	28,6	28,6	38,1	2,4	42,8	54,8

Padrões polimórficos (bp): nd(não digerido) = 304/ 1 = 222, 82/ 2 = 170, 134



Conclusões

Este estudo fornecerá informações relevantes sobre a variabilidade alélica e genotípica do gene DRB3 na população de búfalos Jafarabadi presente no Brasil. O conhecimento da variabilidade genética é fundamental para os programas de conservação genética de rebanhos em risco de extinção, pois permite avaliar a distância entre as populações e auxilia na escolha dos animais a serem utilizados na conservação, mediante a estimativa de índices de similaridade entre indivíduos. Além disso, o conhecimento da diversidade genética intra e inter-raciais poderá evitar a descaracterização, assim como a extinção de raças, possibilitando ainda a indicação de possíveis acasalamentos, evitando, então, a manutenção de animais geneticamente similares (Spritze et al., 2003).

Literatura citada

- AMILLS, M. et al. The major histocompatibility complex of ruminants. **Revue Scientifique Technique**, v. 17, p. 108-120, 1998.
- KUMAR, S. et al. Polymorphism in DRB3 exon by PCR-RFLP and its association with mastitis in Murrah buffaloes. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 232-4, 2011.
- MOIOLI, B.; BHORGUESE, A. **Buffalo Breeds and Management Systems** In: Buffalo Production And Research, Cap. III, Roma: FAO, 2005. Disponível em <http://www.fao.org/docrep/010/ah847e/ah847e00.htm>. Acesso em: abril 202.
- SIGUARDARDOTTIR, S. et al. Cloning and sequence analysis of 14 DRB alleles of the bovine MHC by PCR. **Animal Genetics**, v. 22, p. 199-209, 1991.
- SPRITZE, A.; EGITO, A.A.; MARIANTE, A.S.; MCMANUS, C. Caracterização genética da raça bovina crioula Lageano por marcadores moleculares RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.38, n.10, p.1157-1164. 2003.
- SUMATHI, S. et al. Molecular typing and mapping of MHC class II-DRB3 gene in Indian river buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Indian Journal of Science and Technology**, v. 3, p. 557-60, 2010.