

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**POLIMORFISMO NO GENE DO HORMÔNIO GRELINA EM  
BÚFALAS (*Bubalus bubalis*) E SUA ASSOCIAÇÃO COM  
PRODUÇÃO E QUALIDADE DO LEITE**

**Fernanda Maria Monsalves Gil**  
Zootecnista

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL  
2012

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**POLIMORFISMO NO GENE DO HORMÔNIO GRELINA EM  
BÚFALAS (*Bubalus bubalis*) E SUA ASSOCIAÇÃO COM  
PRODUÇÃO E QUALIDADE DO LEITE**

**Fernanda Maria Monsalves Gil**

Orientador: **Prof. Dr. Humberto Tonhati**

Co-Orientador: **Prof. Dr. Fábio Ricardo Pablos de Souza**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Genética e Melhoramento Animal.

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

G463p Gil, Fernanda Maria Monsalves  
Polimorfismo no gene do hormônio Grelina em Búfalas (*Bubalus bubalis*) e sua associação com produção e qualidade do leite. /  
Fernanda Maria Monsalves Gil. -- Jaboticabal, 2012  
xiv, 42 f. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2012

Orientador: Humberto Tonhati

Banca examinadora: Humberto Tonhati, Luciana Correia de Almeida Regitano, Simone Cristina Méo Niciura, Janete Aparecida Desidério, Jackson Antônio Marcondes de Souza

Bibliografia

1. Associação genética. 2. Búfalos leiteiros. 3. Desequilíbrio de ligação. 4. Marcador molecular. 5. RFLP. 6. SNP. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 636:293.2:575

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

O temor do SENHOR é o princípio do saber, mas  
os loucos desprezam a sabedoria e o ensino  
(Provérbios 1:7)

## OFEREÇO

Ao Prof. Tonhati, pela oportunidade em realizar este trabalho. Pelos ensinamentos, amizade, compreensão, descontração e espontaneidade que todos os seus orientados sabem que só ele tem!

Tonhati, muito obrigada!!

## AGRADECIMENTOS

Ao Senhor Jesus, por sempre ter me provado que Ele está por trás de todas as coisas na minha vida, cuidando de cada uma delas nos seus mínimos detalhes.

Aos meus pais, Alceu e Neusa, pelo incentivo e cuidado diários!

Ao meu marido Batata (Carlos), pela descontração, convivência, por fazer parte da minha vida!

Às minhas irmãs, Sílvia e Paula, e ao meu sobrinho Samuel, pela amizade, descontração e brincadeiras!

À Dê, por lembrar de mim quando surgiu uma oportunidade, pela amizade, por compartilhar seus planos. Obrigada Dê!

Ao meu co-orientador, Fábio, pela paciência em me ensinar as práticas tão básicas no laboratório, pelos ensinamentos, correções e esclarecimentos.

Ao Raul, pelas análises estatísticas, correções. Também pela amizade e disposição em ajudar.

Aos amigos do laboratório, Pat, Grê, Diércles, Gabi, Larissa, João, Marina e Camila pela alegria, convivência, descontração. Sempre lembrarei de vocês!

Aos amigos do departamento, Manu, Daniele, Arione, Naudin, Francisco, Daniel. Obrigada pela convivência!

À banca do exame de qualificação, Profa. Janete Desidério, Profa. Vera Hossepian, Prof. Danísio Munari, Dr. Raul Aspilcueta e Prof. Humberto Tonhati, pelas correções e sugestões.

À banca de defesa, Profa. Janete Desidério, Profa. Simone Niciura, Profa. Luciana Regitano, Prof. Jackson de Souza e Prof. Humberto Tonhati, pelas correções e sugestões.

À Profa. Janete Desidério, pelas disposição em ajudar e cooperar para a finalização deste projeto.

À FCAV – UNESP – Jaboticabal e ao Programa de Pós Graduação em Genética e Melhoramento Animal, pelo curso oferecido.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro!

A todos que me ajudaram durante a execução deste projeto!

## DADOS CURRICULARES DO AUTOR

**Fernanda Maria Monsalves Gil** – casada, nascida em 08 de julho de 1983, na cidade de Ribeirão Preto – SP, filha de Alceu Monsalves e Neusa Maria Rufato Monsalves. Iniciou em fevereiro de 2001 o curso de graduação em Zootecnia na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus de Jaboticabal obtendo o título de Zootecnista em julho de 2005. Durante a graduação, foi incluída no Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC/CNPq/UNESP) sob orientação do Prof. Dr. Paulo Afonso Bellingieri (*in memoriam*). Em março de 2006, ingressou no curso de mestrado pelo Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus de Jaboticabal, como bolsista da Capes sob orientação da Profa. Dra. Lúcia Galvão de Albuquerque e co-orientação da Profa. Dra. Vera Lúcia Cardoso. Em agosto de 2008, iniciou o curso de doutorado pelo Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus de Jaboticabal sob orientação do Prof. Dr. Humberto Tonhati e co-orientação do Prof. Dr. Fábio Ricardo Pablos de Souza.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS .....	viii
LISTA DE TABELAS .....	ix
LISTA DE FIGURAS .....	x
RESUMO .....	xiii
ABSTRACT .....	xiv
1. INTRODUÇÃO .....	01
2. REVISÃO DA LITERATURA .....	02
2.1 Búfalos .....	02
2.2 Marcadores Moleculares .....	04
2.3 Grelina .....	06
3. OBJETIVOS .....	10
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	11
4.1 Material Biológico .....	11
4.2 Desenho dos Iniciadores .....	12
4.3 Técnica de PCR .....	13
4.4 Técnica de PCR-SSCP .....	14
4.5 Sequenciamento dos Fragmentos Amplificados .....	15
4.6 Técnica de PCR-RFLP .....	16
4.7 Análise Genética e Estatística .....	17
4.7.1 Frequências Alélica e Genotípica .....	17
4.7.2 Teste de aderência ao Equilíbrio de <i>Hardy-Weinberg</i> .....	18
4.7.3 Desequilíbrio de Ligação .....	18
4.7.4 Análises de Associação entre os polimorfismos e as características de produção e qualidade do leite .....	18
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	20
5.1 Técnica de PCR-SSCP .....	20
5.2 Sequenciamento dos Fragmentos Amplificados .....	20
5.3 Técnica de PCR-RFLP .....	24
5.4 Análise Genética e Estatística .....	29
5.4.1 Frequências Alélica e Genotípica .....	29
5.4.2 Teste de aderência ao Equilíbrio de <i>Hardy-Weinberg</i> .....	29
5.4.3 Desequilíbrio de Ligação .....	31
5.4.4 Análises de Associação entre os polimorfismos e as características de produção e qualidade do leite .....	32
6. CONCLUSÕES .....	37
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	38



**LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>ABCB</b>	Associação Brasileira de Criadores de Búfalos
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>dNTP</b>	Desorribonucleotídeo trifosfatado
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiaminotetracético
<b>FCAV</b>	Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
<b>GH</b>	Hormônio de crescimento
<b>GHRH</b>	Hormônio liberador de hormônio de crescimento
<b>H-W</b>	<i>Hardy-Weinberg</i>
<b>IBGE</b>	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
<b>MAPA</b>	Ministério da Agricultura e Pecuária
<b>NCBI</b>	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase
<b>RFLP</b>	Polimorfismo do Comprimento do Fragmento de Restrição
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>SAM</b>	Seleção assistida por marcadores
<b>SNP</b>	Polimorfismo de nucleotídeo único
<b>SSCP</b>	Polimorfismo de Conformação de Cadeia Simples
<b>Taq</b>	<i>Termus aquaticus</i>
<b>TBE</b>	Tris/Borato/EDTA
<b>TRIS</b>	Tris(hidroximetil)aminometano
<b>UV</b>	Ultravioleta

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Pares de iniciadores, região e tamanho do produto amplificado e temperatura de anelamento.....	13
Tabela 2 -	Enzimas de restrição utilizadas na técnica de PCR-RFLP com seus respectivos sítios de restrição e temperaturas de clivagem.....	17
Tabela 3 -	Polimorfismos encontrados pelo sequenciamento e localização e posição destes polimorfismos no gene da grelina em Búfalos ( <i>Bubalus bubalis</i> ) para os iniciadores 1, 2, 3 e 5.....	21
Tabela 4 -	Número de animais analisados, frequência alélica, frequência genotípica observada, frequência genotípica esperada segundo o equilíbrio de H-W e valores do teste do $\chi^2_{obs}$ para os polimorfismos encontrados para os iniciadores 1, 2, 3 e 5.....	30
Tabela 5 -	Valores estimados de $r^2$ para os oito SNPs encontrados no gene da grelina.....	31
Tabela 6 -	Médias das produções para as características produção de leite, gordura e proteína e porcentagens de gordura e proteína no leite e, valores nominais de P, para o grupo 1, formado pelo SNP* 1631T/C....	32
Tabela 7 -	Médias das produções para as características produção de leite, gordura e proteína e porcentagens de gordura e proteína no leite e, valores nominais de P, para SNP* 1576T/C que faz parte do grupo 2 ..	33
Tabela 8 -	Médias das produções para as características produção de leite, gordura e proteína e porcentagens de gordura e proteína no leite e, valores nominais de P, para o grupo 3, formado pelo SNP* 1449A/G...	34
Tabela 9 -	Médias das produções para as características produção de leite, gordura e proteína e porcentagens de gordura e proteína no leite e, valores nominais de P, para o SNP* 419T/C.....	34

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Padrões de bandas visualizados pela técnica de SSCP para o par de iniciadores 1, para o gene da Grelina em Búfalos ( <i>B. bubalis</i> ).....	20
Figura 2 -	Polimorfismo 161A/G para o gene da Grelina em Búfalos ( <i>B. bubalis</i> ).....	22
Figura 3 -	Polimorfismo 419T/C para o gene da Grelina em Búfalos ( <i>B. bubalis</i> ).....	22
Figura 4 -	Polimorfismo 1631T/C para o gene da Grelina em Búfalos ( <i>B. bubalis</i> ).....	22
Figura 5 -	Polimorfismo 1479T/C para o gene da Grelina em Búfalos ( <i>B. bubalis</i> ).....	22
Figura 6 -	Polimorfismo 1449A/G para o gene da Grelina em Búfalos ( <i>B. bubalis</i> ).....	23
Figura 7 -	Polimorfismo 1576T/C para o gene da Grelina em Búfalos ( <i>B. bubalis</i> ).....	23
Figura 8 -	Polimorfismo 3564T/C para o gene da Grelina em Búfalos ( <i>B. bubalis</i> ).....	23
Figura 9 -	Polimorfismo 3565G/A para o gene da Grelina em Búfalos ( <i>B. bubalis</i> ).....	23
Figura 10 -	Padrões de migração encontrados pela técnica de PCR-RFLP, representando as três classes genotípicas, AA, AG e GG, para o polimorfismo 161A/G no gene do hormônio da grelina em Búfalos ( <i>B. bubalis</i> ).....	24

- Figura 11 - Padrões de migração encontrados pela técnica de PCR-RFLP, representando as três classes genotípicas, TT, TC e CC, para o polimorfismo 419T/C no gene do hormônio da grelina em Búfalos (*B. bubalis*)..... 25
- Figura 12 - Padrões de migração encontrados pela técnica de PCR-RFLP, representando as três classes genotípicas, TT, TC e CC, para o polimorfismo 1631T/C no gene do hormônio da grelina em Búfalos (*B. bubalis*)..... 25
- Figura 13 - Padrões de migração encontrados pela técnica de PCR-RFLP, representando as três classes genotípicas, TT, TC e CC, para o polimorfismo 1479T/C no gene do hormônio da grelina em Búfalos (*B. bubalis*)..... 26
- Figura 14 - Padrões de migração encontrados pela técnica de PCR-RFLP, representando as três classes genotípicas, GG, GA e AA, para o polimorfismo 1449A/G no gene do hormônio da grelina em Búfalos (*B. bubalis*)..... 27
- Figura 15 - Padrões de migração encontrados pela técnica de PCR-RFLP, representando as três classes genotípicas, TT, TC e CC, para o polimorfismo 1576T/C no gene do hormônio da grelina em Búfalos (*B. bubalis*)..... 27
- Figura 16 - Padrões de migração encontrados pela técnica de PCR-RFLP, representando as três classes genotípicas, CC, TC e TT, para o polimorfismo 3564T/C no gene do hormônio da grelina em Búfalos (*B. bubalis*)..... 28

Figura 17 - Padrões de migração encontrados pela técnica de PCR-RFLP, representando as três classes genotípicas, AA, AG e GG, para o polimorfismo 3565A/G no gene do hormônio da grelina em Búfalos ( <i>B. bubalis</i> ).....	29
--	----

**TÍTULO: POLIMORFISMO NO GENE DO HORMÔNIO GRELINA EM BÚFALAS (*Bubalus bubalis*) E SUA ASSOCIAÇÃO COM PRODUÇÃO E QUALIDADE DO LEITE**

**RESUMO** - A grelina é um hormônio gastrointestinal que possui ação como liberador do hormônio do crescimento e exerce influência no metabolismo geral do organismo, sendo proposto como gene candidato para identificação de marcadores genéticos relacionados a características de crescimento, carcaça e produção de leite. Nesse contexto, objetivou-se verificar a existência de polimorfismos no gene da grelina e suas possíveis associações na produção de leite e seus constituintes em búfalos (*Bubalus bubalis*). Para tanto, um grupo de animais formado por 240 búfalas foi avaliado. Amostras de folículos pilosos dos referidos animais foram utilizadas para extração de DNA. Mediante PCR, foram amplificados fragmentos que, posteriormente, foram analisados pelas técnicas de SSCP e de RFLP, utilizando endonucleases específicas. Para caracterização dos SNPs na população bubalina, foram avaliadas as frequências alélicas e genotípicas, foi realizado o teste de desequilíbrio de ligação e também, análises de variância dos efeitos dos SNPs. Entre os 5 pares de iniciadores estudados, foram encontrados 8 polimorfismos no gene da grelina. Os SNPs 1631T/C e 1449A/G, identificados pelas enzimas *MspI* e *PciI* respectivamente, apresentaram associação com a característica produção de gordura ao nível de significância de 5%. Houve associação também, do SNP 1576T/C, identificado pela enzima *Tsp45I*, com as características produção de gordura e porcentagens de gordura e proteína, ao nível de significância de 5%. Estes SNPs estão localizados em regiões intrônicas do DNA e os íntrons são importantes para a biologia celular, produzem RNAs não codificadores de proteínas que ajudam a regular a maioria dos genes codificadores de proteínas e também, produzem transcritos que interferem com a expressão de proto-oncogenes. Diante disso, supõe-se que possa haver alguma relação destes SNPs identificados em regiões intrônicas e características de composição do leite como, produção e porcentagem de gordura e proteína no leite, podendo, estes SNPs serem utilizados como marcadores moleculares em SAM em Búfalos.

**Palavras-chave:** associação genética, búfalos leiteiros, desequilíbrio de ligação, marcador molecular, RFLP, SNP.

**TITLE: POLYMORPHISM IN THE GENE HORMONE GHRELIN IN BUFFALOES(BUBALUS BUBALIS) AND IT'S ASSOCIATION WITH PRODUCTION AND QUALITY OF MILK.**

**ABSTRACT** - Ghrelin is a gastrointestinal hormone that have action in the releasing of the growth hormone and metabolism of being proposed as candidate gene for the identification of genetic markers related with growth, carcass and milk yield production traits. The aim of the present study was to verify the existence of polymorphisms in the ghrelin gene and their effects in composition and milk yield traits in breed buffaloes (*Bubalus bubalis*). The sample was constituted by 240 buffaloes cows. Hair were used for the extraction of DNA. After PCR, the samples were analyzed by SSCP and RFLP techniques. Among the 5 primers used, were found 8 polymorphisms in the ghrelin gene. The SNPs 1631T/C and 1449A/G, genotyped by the enzymes *MspI* and *PciI*, respectively, presented association with fat yield at 5% of significance. The SNP 1576T/C indentified by the enzyme *Tsp45I*, presented associations with fat and protein percentage at 5%. These SNPs are located in intronic region from DNA and the introns are importants to celular biology, that produce RNAs not encoders of proteins that help to regular the most encoders's genes of proteins and also, that produce transcripts that interfere with the expression's oncogenes. Before addition, is supposed there may be some relation of this SNPs identified in intronic's region and characteristics of composition from milk like, production and percents of fat and protein in to the milk. Therefore, it can be completed these SNPs can be used as moleculars markers in MAS in buffaloes.

**Keywords:** Genetic association, dairy buffaloes, linkage disequilibrium, molecular marker, RFLP, SNP.

## 1. INTRODUÇÃO

Os búfalos foram introduzidos no Brasil há pouco mais de um século e adaptaram-se bem ao clima e às formas de manejo variadas como, o sistema extensivo em áreas alagadas na região Norte e o pastejo em áreas de cerrado na região Sudeste. Em todas as regiões os bubalinos tem-se tornado uma boa opção econômica, principalmente, pela exploração leiteira e conseqüente elaboração do queijo "Mozzarella" (TONHATI et al. 1996). Devido às altas porcentagens de gordura e proteína no leite de búfala é necessário uma menor quantidade de leite de búfala para produzir a mesma quantidade de queijo quando comparado com leite de vaca.

No Brasil, segundo o IBGE (2010), o rebanho bubalino conta com cerca de 1,2 milhões de animais. Em torno de 30% das criações são destinadas à produção leiteira.

Ainda há muitas melhorias que podem ser aplicadas na população bubalina, tanto de manejo quanto de genética. A SAM (Seleção assistida por marcadores) auxilia a genética quantitativa e fornece uma melhor acurácia para o valor genético reduzindo o intervalo entre gerações.

O importante é que se encontre marcadores moleculares associados com características de importância econômica. A produção de grelina é uma boa característica para que se aplique a SAM. A grelina é um hormônio relacionado à ingestão alimentar, portanto, é uma característica de difícil mensuração, principalmente, quando os animais são criados sob pastejo. A grelina também é um importante estimulador do hormônio de crescimento e está relacionada à produção de leite.

Estudar o gene da grelina em *Bubalus bubalis* trará retornos interessantes em vários setores. Inicialmente, para a comunidade científica, onde se verificou escassez de trabalhos que disponibilizem informações relativas à grelina nesta espécie. Além disso, a identificação de polimorfismos neste gene e suas associações com características de produção de leite poderá disponibilizar informações para futuros programas de SAM.



## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Búfalos

Os búfalos são classificados na sub-família Bovinae, gênero *Bubalus*, e são divididos em dois grupos principais: o *Bubalus bubalis* com  $2n=50$  cromossomos, também conhecidos como "River Buffalo" (búfalo-do-rio), e o *Bubalus bubalis* var. *kerebau* ou Carabao com  $2n=48$  cromossomos, composto por apenas uma raça, conhecida como búfalo-do-pântano (Swamp Buffalo). No Brasil, são reconhecidas quatro raças: Mediterrâneo (italiana), Murrah (indiana) e Jafarabadi (indiana), conhecidas como búfalo-do-rio (*Bubalus bubalis bubalis*) e a raça Carabao (sudeste asiático) conhecida como búfalo-do-pântano (*Bubalus bubalis kerebau*).

A bubalinocultura vem se consolidando como uma opção pecuária relevante no Brasil. Segundo o IBGE (2010), a população de búfalos é de 1,2 milhões de cabeças.

Geralmente, os bubalinos destinados à produção de carne, são criados em sistemas extensivos sendo pouco comum a suplementação de volumosos e sem suplementação de alimentos concentrados. Nestas condições, a velocidade de desenvolvimento dos animais costuma acompanhar a oferta alimentar e a sazonalidade reprodutiva da espécie. Na região centro-sul (mais distante da linha do Equador), os búfalos, em relação aos bovinos, apresentam usualmente melhor desempenho pois, os partos costumam ocorrer no verão, período final de maior oferta de pastagens, o que permite às matrizes parto em boas condições corporais e, conseqüentemente, retorno ao cio de forma mais precoce, resultando em taxas de fertilidade mais elevadas que as observadas em bovinos manejados sob condições semelhantes, cujos partos costumam concentrar-se na primavera, após período de relativa escassez de pastagens. É comum que se observem taxas de fertilidade superiores a 80% nos bubalinos, não raro até mesmo acima de 90% (BERNARDES, 2007).

A partir dos anos 90, houve elevado crescimento das unidades industriais produtoras de derivados de leite de búfala no Brasil. Tal crescimento se deve ao alto rendimento industrial do leite bubalino e à possibilidade de se agregar maior valor aos

seus derivados do que aos derivados do leite bovino. Além da tradicional *mozzarella*, existe a possibilidade de se produzir, a partir do leite de búfala, queijos tipo minas frescal, ricota, doce de leite, queijo tipo coalho, iogurte, provolone, dentre outros.

Estima-se que a produção brasileira de leite bubalino seja de 92,3 milhões de litros, produzidos por cerca de 82.000 búfalas em 2.500 rebanhos e que existam pelo menos 150 indústrias produzindo derivados de leite de búfalas no país, que transformam anualmente 45 milhões de litros de leite em 18,5 mil toneladas de derivados, gerando faturamento bruto da ordem de U\$ 55 milhões aos laticínios e de cerca de U\$ 17 milhões aos criadores (BERNARDES, 2007).

A introdução de melhorias de manejo aliada à intensificação do processo de seleção em alguns rebanhos tem permitido a obtenção de níveis produtivos significativamente mais elevados. RAMOS (2005), com base na observação de 4.851 lactações de 865 búfalas filhas de 145 touros diferentes, verificou que a produção média por lactação evoluiu de 794 kg em 1973 para 2.066 kg em 2.003 e atribuiu 8,5% desta evolução como decorrentes de ganho genético e 91,5% às melhorias no manejo. Segundo BERNARDES (2007), há expressiva variabilidade produtiva leiteira na espécie, cuja seleção é ainda incipiente, com produções variando entre 900 kg a 5.142 kg por lactação, o que destaca seu potencial de evolução através da intensificação de processos de seleção, melhoramento genético e de manejo.

Segundo ALBUQUERQUE et al. (2004), gradativamente certas bacias leiteiras têm intensificado o manejo das búfalas leiteiras, gerando a elevação da produtividade média de 1.460 kg/lactação para 2.431 kg em sistemas mais intensificados e para 2.955 kg em propriedades com melhor material genético.

No leite de búfalas, os teores dos principais constituintes são maiores, quando comparados ao leite de bovinos, variando de 6,87% a 8,59% para gordura e de 3,91% a 4,55% para proteína, características que podem ser alteradas por meio de seleção (TONHATI et al., 2000). Esta rica composição confere ao leite de búfalas particularidades na produção, rendimento e qualidade dos derivados obtidos.

Em 2008, o MAPA e a ABCB implementaram o “Programa de Melhoramento Genético de Búfalos Leiteiros no Brasil”, nos moldes do teste de progênie da raça Gir,

com os seguintes propósitos: avaliar e selecionar genótipos superiores mediante estruturação e execução de um programa utilizando teste de progênie; disponibilizar avaliação genética nacional de touros e vacas de modo a permitir a eleição de machos jovens para serem testados; e fomentar práticas gerais de manejo e pesquisas aplicadas em genética e melhoramento animal (TONHATI et al., 2006).

## **2.2 Marcadores Moleculares**

SNPs (polimorfismos de nucleotídeos únicos) são variações dispersas por todo o código genético. Eles correspondem a posições onde existe uma alternativa dos nucleotídeos A, C, G e T. Atualmente, os SNPs podem ser empregados em diversas áreas, como medicina forense, antropologia molecular, evolução, genética de populações, definição de marcadores de predisposição a determinadas patologias e de prognóstico a diferentes tratamentos, entre outras.

Apesar da existência de diversas técnicas modernas, técnicas como PCR (Reação em cadeia da polimerase), PCR-RFLP (Polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição), PCR-SSCP (Polimorfismo de Conformação de Cadeia Simples) e sequenciamento ainda são utilizadas para estudos de marcadores moleculares. Pesquisadores como SUN et al. (2011), KOWALEWSKA-ŁUCZAK et al. (2011) e TANPURE et al. (2012) utilizaram estas técnicas que foram precisas para a detecção de polimorfismos.

A técnica de PCR é muito utilizada e ainda serve de base para outras técnicas moleculares. Ela baseia-se na amplificação exponencial de uma sequência genômica alvo, pela utilização de um par de iniciadores, que flanqueiam a região genômica que se pretende amplificar pela ação de uma DNA polimerase termo-resistente, em geral a Taq DNA polimerase. Os passos da PCR são automaticamente executados num termociclador e constam de três etapas: 1) desnaturação: o DNA molde é aquecido à 94-95°C, fazendo com que sua dupla fita se desnature em duas fitas simples; 2) anelamento: a temperatura abaixa até aquela considerada ótima para que os iniciadores se anelem a regiões homólogas do genoma; 3) polimerização: a temperatura

é mantida a 72°C para que a Taq polimerase, proceda a polimerização das fitas complementares a partir dos iniciadores, transformando uma fita dupla de DNA em duas fitas duplas. Estas etapas são repetidas em torno de 30 ciclos a fim de obter-se mais de um bilhão de cópias da sequência alvo e prosseguir para as demais análises necessárias (MULLIS, 1990).

As metodologias de PCR-RFLP e PCR-SSCP utilizam a técnicas de PCR como primeira etapa nos procedimentos laboratoriais. A PCR-RFLP consiste em submeter o produto da PCR a clivagem com enzimas de restrição, visando a detecção de polimorfismos. Isto gera fragmentos de DNA de tamanhos diferentes possibilitando assim, a genotipagem dos animais.

A técnica de PCR-SSCP baseia-se em pequenas variações na sequência de nucleotídeos do fragmento de DNA amplificado. Consiste em expor os fragmentos de DNA a uma reação físico-química com o intuito de quebrar as pontes de hidrogênio da dupla fita separando-a, ocorrendo então um rearranjo entre as fitas simples em cada uma das amostras. A ocorrência de uma simples mudança de base nitrogenada na fita simples de uma amostra, pode gerar um rearranjo diferenciado na cadeia, causando a alteração do padrão de migração das bandas evidenciando o polimorfismo. O produto da amplificação por PCR é aquecido a 94°C para separação da dupla fita de DNA. Depois, as amostras são aplicadas em gel de poliacrilamida e a revelação deste gel é feita com nitrato de prata. A migração das amostras será diferente no gel, de acordo com o nucleotídeo que a amostra possui e assim, torna-se possível identificar polimorfismos (PEREIRA, 2008; VALENTE et al., 2001).

Os polimorfismos podem ser utilizados em programas de SAM que consiste em selecionar indivíduos que possuem alelos favoráveis para os genes envolvidos com as características em questão baseada na avaliação direta de seu DNA (MARTINEZ & MACHADO, 2002). A SAM além de gerar aumento da precisão na avaliação genética, proporciona melhor controle sobre os processos de produção e também sobre os produtos gerados, fazendo com que aumente a qualidade e diminua a variação da matéria produzida.

A eficiência de um programa de melhoramento genético depende diretamente da precisão com que os indivíduos são avaliados. Segundo MARTINEZ & MACHADO (2002), em muitas situações o fenótipo não é uma indicação precisa do genótipo, pois características produtivas dependem da variação alélica em um grande número de locos, e a expressão gênica destes locos é altamente afetada por fatores de meio ambiente. Assim, a seleção de indivíduos baseada na associação entre dados fenotípicos e informações genômicas é de grande valia.

### 2.3 Grelina

A grelina é um hormônio gastrointestinal identificado no estômago de ratos, em 1999, por KOJIMA et al. Segundo os autores, o nome grelina origina-se da palavra *ghre*, que na linguagem Proto-Indo-Européia é correspondente, em inglês, à palavra *grow*, que significa crescimento. Tal peptídeo é composto por 28 aminoácidos com uma modificação octanóica no seu grupo hidroxil sobre a serina 3, que é essencial para o desempenho de sua função liberadora de GH (Hormônio de crescimento) (BEDNAREK et al., 2000). Ela foi, primeiramente, isolada da mucosa oxíntica do estômago, sendo produzida, predominantemente, pelas células Gr do trato gastrointestinal. Segundo KOJIMA et al. (1999), é produzida em menores quantidades no sistema nervoso central, rins, placenta e coração.

O hormônio grelina é um potente estimulador da liberação de GH, nas células somatotróficas da hipófise e do hipotálamo, sendo o ligante endógeno para o receptor de GH (GHS-R). Assim, a descoberta da grelina evidenciou um sistema regulatório para a secreção de GH distinto da regulação mediada pelo GHRH (Hormônio liberador de hormônio de crescimento).

Ressalta-se que o GH é um dos mais importantes hormônios galactopoiéticos e exerce influência na distribuição de nutrientes para a produção de leite em vacas lactantes (SEJRSEN et al., 1999).

Ruminantes domésticos como bovinos, caprinos e ovinos possuem o sistema gastrointestinal-digestivo diferente daquele presente em espécies monogástricas, como

roedores e humanos. Entretanto, a grelina foi identificada em glândulas oxínticas do abomaso de bovinos (HAYASHIDA et al., 2001; MIURA, 2004) e foi constatado que injeções intracerebroventriculares do referido hormônio causaram significativa liberação de GH em cabras Shiba (HAYASHIDA et al., 2001). Tais informações sugerem que a grelina pode desempenhar um papel considerável na regulação da secreção de GH em ruminantes.

ITOH et al. (2005) compararam bovinos da raça holandesa em vários estados fisiológicos, administrando injeções intravenosas de grelina e GHRH em bezerros lactentes e desmamados, primíparas no início da lactação, múltiparas no meio da lactação, vacas prenhas e vacas maduras. A interpretação dos dados demonstrou alterações da indução da secreção de GH pela grelina e GHRH. A secreção do GH induzida pela administração de grelina foi maior nos animais no início da lactação. Já a secreção do GH induzida pela administração de GHRH foi maior nos bezerros. Os resultados sugerem que o GHRH pode ser importante no controle da secreção de GH durante os períodos de crescimento, e a grelina pode ser importante durante o período da lactação do gado leiteiro. ITOH et al. (2005) também compararam concentrações de grelina e GH nos vários estados fisiológicos de animais da raça holandesa e concluíram que as concentrações plasmáticas de GH são superiores em animais em crescimento, tais como os vitelos, e depois, gradualmente, diminui com o envelhecimento do animal, no entanto, as concentrações de GH aumentam novamente no período de lactação. Como o GH é um dos hormônios mais importantes na manutenção da produção de leite em vacas leiteiras, a grelina pode contribuir para o desempenho da lactação, pela indução de secreção de GH.

Em um estudo realizado com cabras, HASHIZUME et al. (2004) testaram doses de 1 ou 3 µg/kg de peso corporal de grelina. A dose de 3 µg/kg de grelina foi a que apresentou significativo aumento na concentração de GH no plasma. Aproximadamente 2 meses após as últimas injeções, as cabras receberam doses de 3 µg/kg de grelina ou 0,25 µg/kg de GHRH e a resposta secretória a 3 µg/kg de grelina foi menor que a resposta secretória ao GHRH. Os mesmos autores ainda fizeram uma infusão de 10 nmoL de grelina no hipotálamo basal medial de vitelos bovinos e isto estimulou

significativamente a liberação de GH. Estes resultados demonstram que a grelina estimula a secreção de GH em ruminantes, apesar de em menor intensidade em relação ao GHRH.

Além de sua ação como liberador de GH, a grelina possui outras importantes atividades, incluindo estimulação da secreção lactotrófica e corticotrófica, influência sobre o eixo hipofisário-gonadal, atividade orexígena acoplada ao controle do gasto energético; controle da secreção ácida e da motilidade gástrica, influência sobre a função endócrina pancreática e metabolismo da glicose e ainda ações cardiovasculares e efeitos antiproliferativos em células neoplásicas (KOJIMA et al., 1999; DATE et al., 2000).

Estudos em modelos animais indicam que a grelina desempenha importante papel na sinalização dos centros hipotalâmicos que regulam a ingestão alimentar e o balanço energético (NAKAZATO et al., 2001). Segundo UKKOLA et al. (2002), citado por ROMERO & ZANESCO (2006), recentes estudos com roedores sugerem que a grelina, administrada periféricamente ou centralmente, independentemente do GH, diminui a oxidação das gorduras e aumenta a ingestão alimentar e a adiposidade. Assim, esse hormônio parece estar envolvido no estímulo para iniciar uma refeição (ROSICKÁ et al., 2003).

Segundo LEIDY et al.(2004), citado por ROMERO & ZANESCO (2006), a grelina está diretamente envolvida na regulação a curto prazo do balanço energético. Concentrações circulantes de grelina encontram-se aumentados durante jejum prolongado e em estados de hipoglicemia, e diminuídas após a refeição ou administração intravenosa de glicose.

ROCHE et al. (2006) realizaram um estudo para determinar se a seleção genética para produção de leite resultaria em aumento na concentração plasmática de grelina em vacas holandesas sob pastejo e, concluíram que as vacas com maior mérito genético para produção de leite, possuíam maiores concentrações plasmáticas de grelina e de hormônio de crescimento, associado com um aumento de consumo de matéria seca por estes animais.

Em um trabalho realizado por SUN et al. (2011), foram detectados 11 polimorfismos no gene da grelina em regiões não codificadoras, em 5 raças bovinas chinesas, através da técnica de PCR-SSCP. Foram feitas análises destes SNP com as características peso corporal, ganho médio diário, tamanho corporal em diferentes períodos (6, 12, 18 e 24 meses de idade), produção de leite aos 305 dias, taxa de proteína no leite, porcentagem de gordura, porém, nenhum destes SNPs apresentou associação significativa com estas características.

KOWALEWSKA-ŁUCZAK et al. (2011) analisaram o gene da grelina em 169 vacas holandesas, linhagem vermelho e branco, e encontraram um polimorfismo GA no íntron 3 do gene. Os autores realizaram análises de associação deste polimorfismo com características de produção e qualidade do leite, porém, não foram encontradas diferenças significativas entre os genótipos descritos.

O gene da grelina humano está localizado no 3q25–26, é composto por quatro éxons e três íntrons (WAJNRAJCH et al., 2000) e codifica uma molécula denominada pré-pro-grelina (KOJIMA et al., 1999). O gene bovino da grelina está localizado no cromossomo 22 (BTA22), sendo constituído por 5 éxons e 4 íntrons (COLINET et al., 2009).

Para búfalos, há sequências e polimorfismos depositados no NCBI (National Center for Biotechnology Information), disponível em: [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov), pelo número de acesso JQ647511.1.



### 3. OBJETIVOS

Identificar polimorfismos no gene da grelina em Búfalos (*Bubalus bubalis*) e verificar suas associações com características de produção de leite, gordura e proteína e porcentagens de gordura e proteína no leite.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Material Biológico

Foram colhidos pelos da vassoura da cauda de 240 búfalas, pertencentes a uma fazenda localizada no estado de São Paulo, município de Dourado. Esta fazenda integra o programa de controle leiteiro de bubalinos mantidos pelo Departamento de Zootecnia da Unesp/Jaboticabal, SP. Mensalmente a propriedade é visitada para realização do controle leiteiro e colheita de amostras para determinação do conteúdo de gordura e proteína, assim como, do material biológico para extração de DNA.

As extrações de DNA das amostras de pêlo coletadas foram realizadas a partir da metodologia descrita por LIMA (2003). Cerca de 40 folículos/animal foram depositados em um tubo de microcentrífuga (1,5 mL) e centrifugados rapidamente. Em seguida, adicionaram-se 500 µL de solução TE-Tween (Tris 50 mM, EDTA 1 mM, 0,5% Tween 20) em cada amostra, seguindo à incubação no banho a 65°C por 1,5 horas, com agitação periódica; após esse período, adicionou-se 2 µL de proteinase K/tubo (600 µg/µL) e incubou-se a 55 °C por 6 horas, com agitação periódica; e em seguida incubou-se a 37 °C por uma noite.

Após esses procedimentos, adicionou-se 1 volume de PCI (Fenol-Clorofórmio-Álcool isoamílico) para 1 volume de amostra, agitou-se vigorosamente os tubos por 10 segundos em agitador automático. Posteriormente, centrifugou-se por 10 minutos a 12000 rpm a 23 °C e o sobrenadante foi transferido para novo tubo.

O volume final dessa fase foi de aproximadamente 300 µL. Em seguida foi feita a precipitação do DNA com 1/10 do volume da amostra de acetato de sódio 0,3 M (aproximadamente 30 µL) e etanol absoluto gelado (aproximadamente 1 mL). Após misturar por inversão, os tubos foram colocados no freezer – 80 °C por 1 hora. Prosseguiu-se com centrifugação a 4 °C por 25 minutos a 12000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o DNA remanescente foi completamente seco em temperatura ambiente, e em seguida armazenado em 100 µL de TE (10:1).

Após as extrações, as amostras de DNA foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TBE 1X (Tris-HCl 89 mM; EDTA 2,5 mM e Ácido Bórico 89 mM e pH 8,3) com gelred (4 $\mu$ L/mL) a 100V, por aproximadamente 50 minutos.

Após a extração, as amostras de DNA foram quantificadas pelo aparelho do espectrofotômetro (Nanodrop 1000, Thermo Scientific, EUA, 2008) para verificação de quantidade e qualidade do material obtido. A quantificação baseada na absorbância advém do fato de o DNA possuir pico de absorbância de luz no comprimento de 260 nm. Assim, a concentração é medida pela relação  $1 \text{ OD}_{260} = 50 \mu\text{g/mL DNA}$ .

A qualidade é medida pela relação de absorbância A260/A280. Proteínas têm pico de absorbância de 280nm e essas podem ser possíveis contaminantes da solução de DNA. Assim sendo, espera-se que a relação A260/A280 esteja entre 1,8 e 2,0. A relação inferior a 1,8 sugere contaminação com proteína. Após a constatação desses parâmetros, a solução estoque foi diluída a 70 ng/ $\mu$ L em solução uso. Ambas foram congeladas em freezer.

#### 4.2 Desenho dos Iniciadores

Foram desenhados seis iniciadores (Tabela 1) basendo-se na seqüência relativa a *Bubalus bubalis* do gene da grelina depositada no GenBank, sob código de acesso EF583468.1. Esta sequência possui 3995 pares de bases e possui três êxons e três íntrons. Os pares de iniciadores foram feitos por meio do uso do programa Primer3 disponível no site (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) e a qualidade foi verificada pelo site (<http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>) em que se procurou optar por iniciadores com  $\Delta G$  maior que zero, que não formassem *hairpin*, dímeros de um mesmo primer e entre *primers*.

Tabela 1: Pares de iniciadores, região e tamanho do produto amplificado e temperatura de anelamento.

Número dos iniciadores	Iniciadores	Região do fragmento amplificado	Tamanho do fragmento amplificado (pb)	Temperatura de pareamento dos iniciadores (°C)
1	D*: GCCATGCCCCGCCCCGTGGAC R**: GAAGTCAGGCGGAAGGTGCAGA	Éxon 1, Íntron 1 e parte do Éxon 2	408	57
2	D*: AGCACCTCCTCTTTCTGCAGAG R**: TAGGTCTCTGCCATCAACAGGCAA	Éxon 2 e parte do Íntron 2	281	63,4
3	D*: TGCATTGCCAGGTGGGTTCTTTAC R**: ACTTGATGACGGCCTGCAGATTCT	Parte do Íntron 2	402	63,6
4	D*: TGACGTCTTCCGAAGCTGAAAGGT R**: AGTCCTTGCCCAGATCACATCCAT	Parte do Íntron 2 e Éxon 3	444	60,2
5	D*: TGTGAGCCTGCCCATGAGTAACAA R**: GCATTCAGAAACCCTGGCTGATGA	Íntron 3	448	59,5

\*Iniciador direto; \*\*Iniciador reverso

#### 4.3 Técnica de PCR

As reações de PCR foram realizadas a partir do DNA extraído do pelo dos animais, sendo constituídas de 12,5 µL de GoTaq Colorless Master Mix 2X Taq DNA Polymorase; 15 pM de cada iniciador (direto e reverso); 7,5 µL de água ultra pura e 100 ng de DNA genômico, obtendo-se 25 µL de volume final por reação.

Para todos os pares de iniciadores em estudo, realizou-se uma PCR gradiente para detecção da temperatura ideal de pareamento dos iniciadores. Os ciclos de amplificação seguiram a programação em termociclador MasterCycler Gradient 5331 Eppendorff®, Alemanha, 2005. O ciclo seguiu a seguinte programação:

- 1º passo: desnaturação inicial do DNA - 94°C por 5 minutos;
- 2º passo: desnaturação do DNA no ciclo - 94°C por 45 segundos;
- 3º passo: pareamento dos iniciadores - 57,0°C (iniciador 1), 63,4°C (iniciador 2), 63,6°C (iniciador 3), 60,2°C (iniciador 4) e 59,5°C (iniciador 5). Todos por 45 segundos;
- 4º passo: extensão do DNA no ciclo - 72°C por 45 segundos;
- 5º passo: extensão final do DNA - 72°C por 5 minutos.

O ciclo repetiu-se do segundo ao quarto passo por 39 vezes. Após o quinto passo, as amostras foram mantidas a 4° C até a retirada do termociclador.

Após a amplificação, uma alíquota de 3 µL de cada amostra foi diluída com 2 µL de tampão de corrida (4µL/mL de gelred) e foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,5%, em tampão TBE 1 X (Tris-HCl 89 mM; EDTA 2,5 mM e Ácido Bórico 89 mM e pH 8,3) a 90 V, por aproximadamente 50 minutos. A visualização foi feita em luz UV (ultravioleta), o gel foi fotodocumentado em aparelho Gel-Doc (Bio-Rad) e analisado com o software Image Analyis da Kodak, visando avaliar a eficiência da PCR em função do tamanho do fragmento amplificado. As amostras foram mantidas a 4°C até análises pela técnica de SSCP (Polimorfismo de Conformação de Cadeia Simples).

#### **4.4 Técnica de PCR-SSCP**

Para esta técnica utilizaram-se 4 µL de produto de PCR e 4 µL de Tampão de SSCP (95% formamida, 20 mM EDTA 0,05% azul de bromofenol e 0,05% xileno-cianol) para volume final de 8 µL. As amostras foram desnaturadas a 95°C por 5 min de acordo com a metodologia descrita por ORITA et al. (1989) e incubadas em gelo. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel acrilamida:bis-acrilamida (29:1), à 6%, em condição não desnaturante, utilizando o sistema mini-protean II da BioRad. Os géis foram preparados utilizando-se acrilamida:bis-acrilamida (29:1) suficiente para atingir a concentração desejada, 600 µL de TBE 10X (0,9 M Tris, 0,02 M EDTA, 0,09 M ácido bórico e pH 8,3), 60 µL de APS 10% e 6 µL de TEMED e água milli-Q para completar o volume de 6 mL. Após eletroforese por 3 horas a 48 mA, a revelação dos géis de

poliacrilamida foi feita com nitrato de prata, segundo o método de BASSAN et al. (1991) conforme protocolo abaixo:

1. Agitação por 5 minutos em solução contendo 0,15% de nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ), 20% de etanol e 1% de ácido acético glacial.
2. Agitação por 5 minutos em solução reveladora contendo 2,2% de hidróxido de sódio ( $\text{NaOH}$ ), 0,5% de formaldeído.
3. Agitação por 5 minutos em solução fixadora contendo 20% de álcool etanol, 1% de ácido acético glacial.

Para cada par de iniciadores utilizado, realizou-se análise de SSCP para 100 animais aleatoriamente. Somente as amostras polimórficas foram destinadas ao sequenciamento.

#### **4.5 Sequenciamento dos Fragmentos Amplificados**

Duas amostras de DNA de cada um dos diferentes padrões de migração observados para os iniciadores 1, 2, 3, 4 e 5 pela técnica de SSCP, foram submetidas à purificação, seguindo o protocolo recomendado pelo kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega, EUA.

O produto de PCR foi sequenciado a partir de ambos iniciadores (direto e reverso) usando a técnica de terminação de cadeia por dideoxynucleotídeos (ddNTPs), descrita por SANGER et al. (1977). Foi utilizado o ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems) e um sequenciador automático ABI 3730 XL (Applied Biosystems). As análises foram realizadas no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Departamento de Tecnologia da FCAV.

As sequências dos fragmentos do gene da grelina analisados, foram alinhadas por meio do programa para alinhamento de sequências múltiplas Códon Code (<http://www.codoncode.com/aligner/download.htm>), com as sequências publicadas no GenBank, as quais foram tomadas como referência para identificação do polimorfismo.

#### 4.6 Técnica de PCR-RFLP

Após o sequenciamento, as sequências foram submetidas à análise de fragmentos para a detecção de enzimas de restrição que reconhecessem os sítios polimórficos por meio do programa Webcutter 2.0, disponível no site da BioLabs (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>), que identificou enzimas que reconheciam os possíveis polimorfismos detectados.

Com as enzimas já identificadas, na técnica de PCR-RFLP, o fragmento amplificado por PCR foi digerido durante uma hora à temperatura específica para cada enzima de restrição (Tabela 2) em termociclador MasterCycler Gradient 5331 Eppendorff®, Alemanha, 2005. Para as reações de RFLP utilizou-se 2,5 µL de produto de PCR, 5 U de enzima de restrição específica para cada polimorfismo, 1/10 de tampão específico para cada enzima em volume final de 7,5 µL. Em seguida, as amostras foram diluídas com 2 µL de tampão de corrida (4µL/mL de gelred) e submetidas à eletroforese em gel de agarose (3,0%), com tampão TBE 1X (Tris-HCl 89 mM; EDTA 2,5 mM e Ácido Bórico 89 mM e pH 8,3) por aproximadamente 1,5 horas a 100 volts. A visualização foi feita em luz UV e o gel foi fotodocumentado em aparelho Gel-Doc (Bio-Rad), visando avaliar o padrão de migração das amostras.

Tabela 2: Enzimas de restrição utilizadas na técnica de PCR-RFLP com seus respectivos sítios de restrição e temperaturas de clivagem.

SNP	Iniciador	Polimorfismos encontrados	Enzima de restrição utilizada para genotipagem	Sítio de restrição da enzima	Temperatura de clivagem da enzima de restrição
161A/G	1	A/G	<i>Bst</i> UI	5'... C G ▼ C G ... 3'	60°C
419T/C	2	T/C	<i>Bcl</i> I	5'... C C A T C (N <sub>4</sub> ) ▼ ... 3'	37°C
1631A/G	3	T/C	<i>Msp</i> I	5'... C ▼ C G G ... 3'	37°C
1479T/C		T/C	<i>Nco</i> I	5'... C ▼ C A T G G ... 3'	37°C
1449T/C		A/G	<i>Pci</i> I	5'... A ▼ C A T G T ... 3'	37°C
1576T/C		T/C	<i>Tsp</i> 45I	5'... ▼ G T S A C ... 3'	65°C
3564T/C	5	T/C	<i>Hinf</i> I	5'... G ▼ A N T C ... 3'	37°C
3565A/G		A/G	<i>Tsp</i> 45I	5'... ▼ G T S A C ... 3'	65°C

## 4.7 Análise Genética e Estatística

### 4.7.1 Frequências Alélica e Genotípica

As frequências alélicas (xi) para o alelo da grelina (i), e genotípicas (xii) para o genótipo (ii), foram estabelecidas para a população, pelas Equações 1 e 2:

$$x_i = \frac{2n_{ii} + n_{ij}}{2N} \quad [\text{Eq. 1}]$$

$$x_{ii} = \frac{n_{ii}}{N} \quad [\text{Eq. 2}]$$

Em que  $n_{ii}$  e  $n_{ij}$  correspondem ao número de homozigotos e heterozigotos observados no alelo  $i$ , respectivamente;  $N$  corresponde ao número de indivíduos analisados.



#### 4.7.2 Teste de aderência ao Equilíbrio de *Hardy-Weinberg*

Pelo teorema de H-W (*Hardy-Weinberg*), as frequências genótípicas esperadas, em equilíbrio, podem ser estimadas a partir da expansão do binômio:

$$(x_i + x_j)^2 = x_i^2 + 2x_ix_j + x_j^2 \quad [\text{Eq.3}]$$

Em que  $x_i^2$  = frequência esperada dos homozigotos para o alelo  $i$ ;  $2x_ix_j$  = frequência esperada para heterozigotos  $ij$ ;  $x_j^2$  = frequência esperada dos homozigotos para o alelo  $j$ .

Para testar a aderência das frequências observadas ao equilíbrio de H-W foi usado o teste de Qui-Quadrado ( $\chi^2$ ) com significância de 5%.

#### 4.7.3 Desequilíbrio de Ligação

O desequilíbrio de ligação ( $r^2$ ) foi estimado com o uso do programa computacional Plink (disponível no site <http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink/>) com o objetivo de verificar quais os SNPs que segregavam juntos.

Considerando-se dois *loci* com dois alelos para cada *locus* (A1/A2 e B1/B2), tem-se que:

$r^2 = D^2 / [\text{freq}(A1) * \text{freq}(A2) * \text{freq}(B1) * \text{freq}(B2)]$  (HILL e ROBERTSON, 1966) em que:

$$D = \text{freq}(A1\_B1) * \text{freq}(A2\_B2) - \text{freq}(A1\_B2) * \text{freq}(A2\_B1) \text{ (HILL, 1981).}$$

#### 4.7.4 Análises de associação entre os polimorfismos e as características de produção e qualidade do leite

Para verificar a associação desses SNPs com as características produção de leite, gordura e proteína e as porcentagens de gordura e proteína foi utilizado o seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ijkl} = \mu + GC_i + S_j + M_k + \beta_1(I_{ijkl} - \bar{I}) + \beta_2(I_{ijkl} - \bar{I})^2 + e_{ijkl}$$

Onde:

$Y_{ijkl}$  = produção de leite e porcentagens de gordura e proteína do leite;

$\mu$  = constante inerente a todas as observações;

$GC_i$  = efeito fixo do grupo de contemporâneo;

$S_j$  = efeito aleatório do touro, com média 0 e variância  $\sigma_s^2$ ;

$M_k$  = efeito fixo do SNP;

$\beta_1$  = coeficiente de regressão linear da característica  $Y_{ijkl}$  em relação à idade da vaca na mensuração;

$\beta_2$  = coeficiente de regressão quadrática da característica  $Y_{ijkl}$  em relação à idade da vaca na mensuração;

$I_{ijkl}$  = idade da vaca avaliada à mensuração;

$\bar{I}$  = média da idade das vacas avaliadas à mensuração;

$e_{ijkl}$  = efeito aleatório residual associado à característica  $Y_{ijkl}$  com média 0 e variância  $\sigma_e^2$ .

O grupo contemporâneo foi considerado a concatenação de ano e estação de parto. A análise de variância foi realizada através do proc mixed do pacote SAS que tem a opção da utilização da função da máxima verossimilhança restrita. As médias das produções de leite, gordura e proteína e as porcentagens de gordura e proteína para os diferentes genótipos foram comparadas utilizando-se o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Técnica de PCR-SSCP

A técnica de PCR-SSCP é bastante sensível para a detecção de mutações de ponto que posteriormente podem ser genotipadas em maior número de indivíduos pela técnica de PCR-RFLP (VALENTE et al., 2001). A Figura 1 apresenta os padrões de bandas encontrados para o par de iniciadores 1.

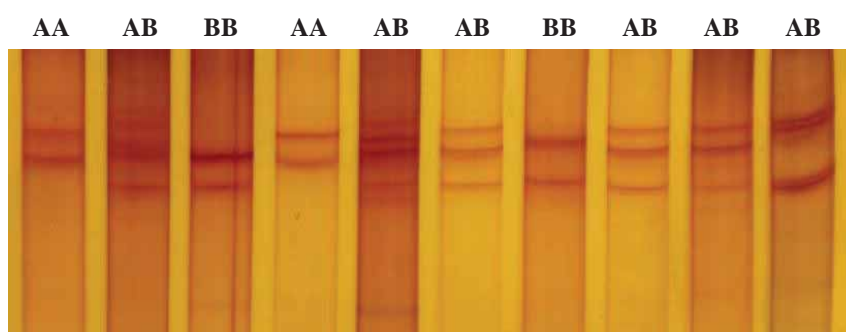


Figura 1 - Padrões de bandas visualizados pela técnica de SSCP para o par de iniciadores 1, para o gene da Grelina em Búfalos (*B. bubalis*).

Pela técnica de SSCP, os iniciadores 1, 2, 3, e 5 apresentaram padrão polimórfico de bandas e, então, prosseguiu-se para análises pela técnica do sequenciamento para confirmação dos resultados. O par de iniciador 4 apresentou resultado monomórfico.

### 5.2 Sequenciamento dos Fragmentos Amplificados

A Tabela 3 apresenta os polimorfismos encontrados e a posição destes no gene.

Tabela 3: Polimorfismos encontrados pelo sequenciamento e localização e posição destes polimorfismos no gene da grelina em Búfalos (*Bubalus bubalis*) para os iniciadores 1, 2, 3 e 5.

SNP*	Iniciador	Polimorfismos encontrados	Localização do polimorfismo	Posição do polimorfismo no gene
161A/G	1	A/G	Íntron 1	161
419T/C	2	T/C	Éxon 2	419
1631T/C	3	T/C	Íntron 2	1631
1479T/C		T/C	Íntron 2	1479
1449A/G		A/G	Íntron 2	1449
1576T/C		T/C	Íntron 2	1576
3564T/C	5	T/C	Íntron 3	3564
3565A/G		A/G	Íntron 3	3565

\*SNP: *Single nucleotide polymorphism*

O polimorfismo 419T/C, delimitado pelo iniciador 2, na posição 419 do gene, foi o único encontrado na região codificadora do gene. Portanto, houve substituição da trinca ATG pela trinca ACG, ou seja, houve substituição do aminoácido metionina pelo aminoácido treonina na proteína.

As sequências e polimorfismos encontrados foram submetidos ao NCBI, disponível em: [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov), pelo número de acesso JQ647511.1.

As Figuras 2 a 9 apresentam os polimorfismos encontrados pelo sequenciamento para os iniciadores 1, 2, 3 e 5.

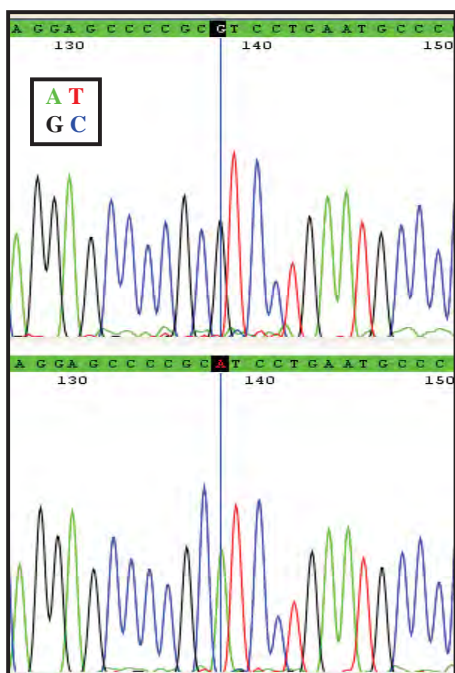


Figura 2 - Polimorfismo 161A/G para o gene da Grelina em Búfalos (*B. bubalis*).

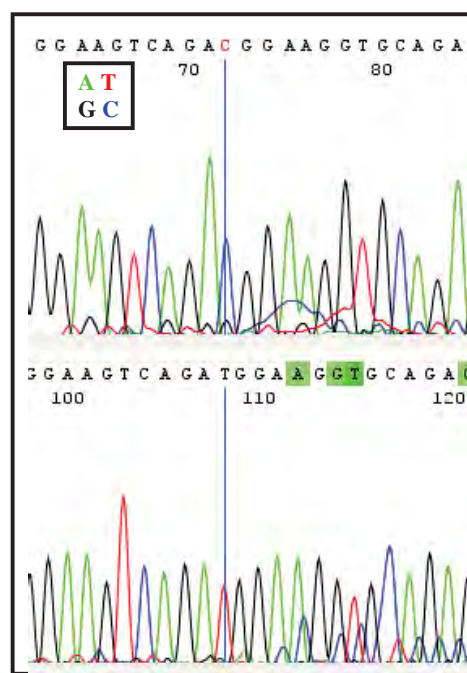


Figura 3 - Polimorfismo 419T/C para o gene da Grelina em Búfalos (*B. bubalis*).

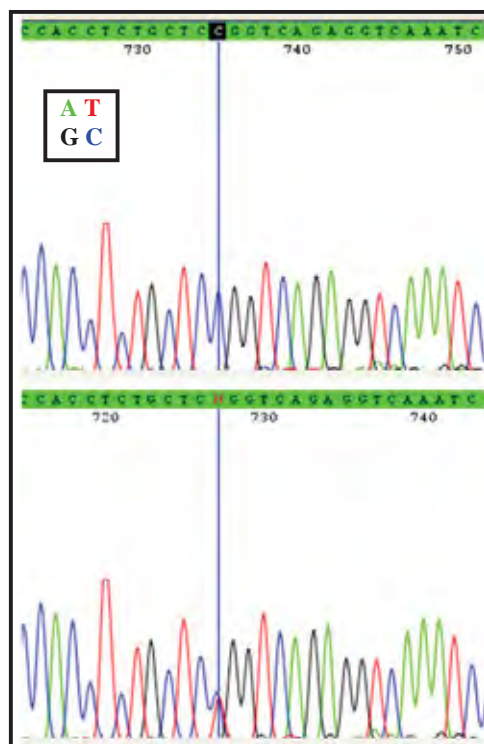


Figura 4 - Polimorfismo 1631T/C para o gene da Grelina em Búfalos (*B. bubalis*).

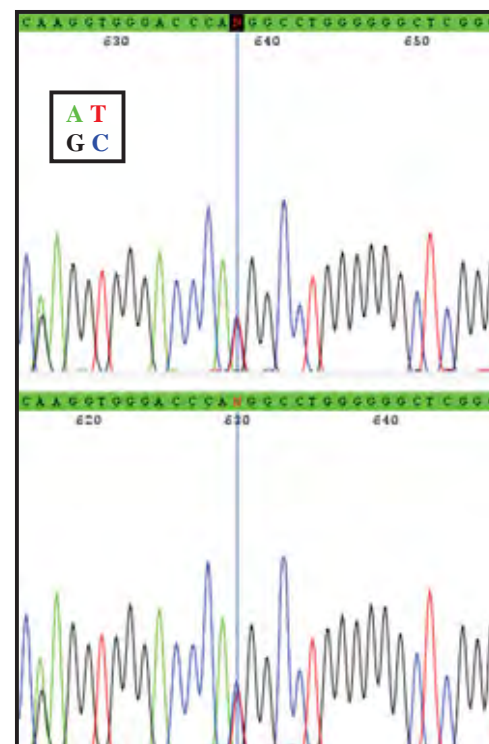


Figura 5 - Polimorfismo 1479T/C para o gene da Grelina em Búfalos (*B. bubalis*).

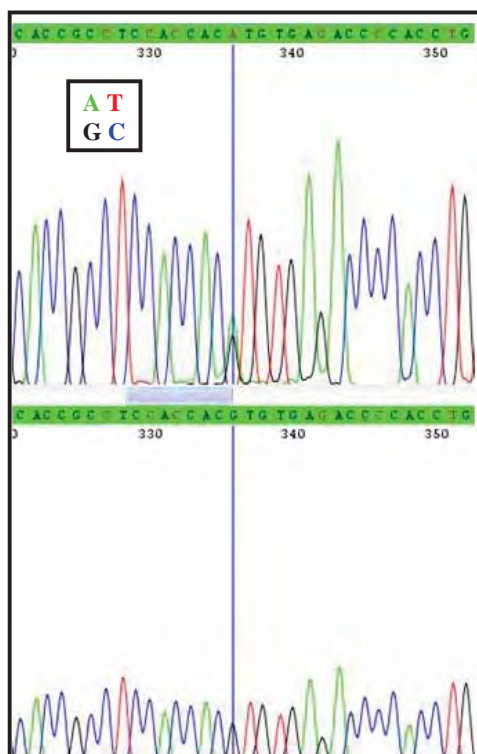


Figura 6 - Polimorfismo 1449A/G para o gene da Grelina em Búfalos (*B. bubalis*).

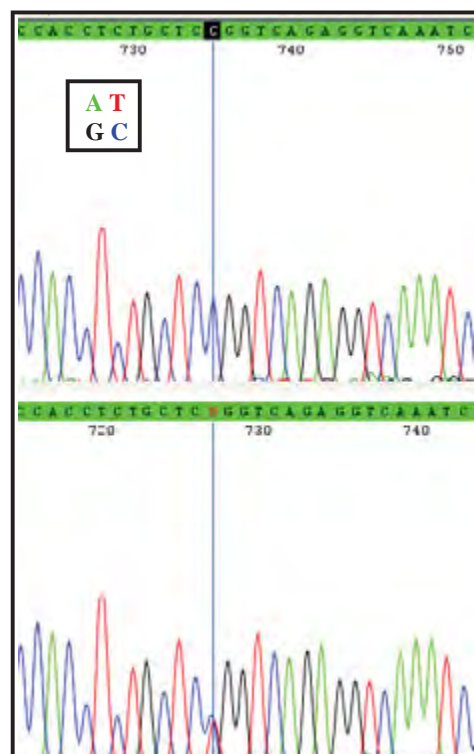


Figura 7 - Polimorfismo 1576T/C para o gene da Grelina em Búfalos (*B. bubalis*).

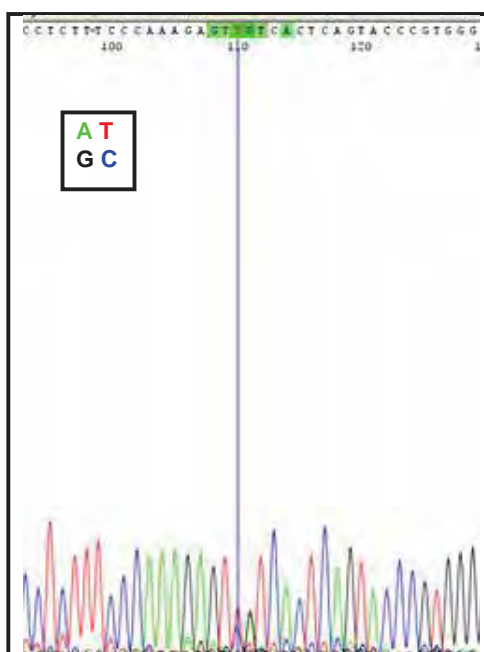


Figura 8 - Polimorfismo 3564T/C para o gene da Grelina em Búfalos (*B. bubalis*).

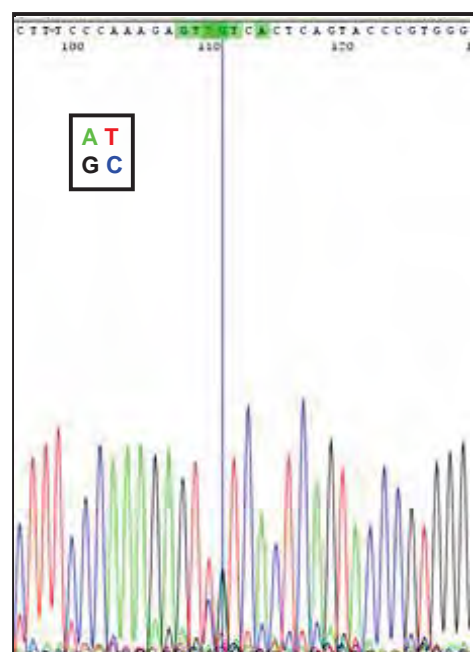


Figura 9 - Polimorfismo 3565G/A para o gene da Grelina em Búfalos (*B. bubalis*).

### 5.3 Técnica de PCR- RFLP

Para a enzima *Bst*UI, utilizada para caracterizar o polimorfismo 161A/G, através da análise pelo webcutter esperava-se 3 padrões de bandas, um de 136 pb, um de 272 pb e outro de 408 pb. O genótipo AA caracterizou-se pela banda 408 pb, o genótipo AG pelas bandas 136, 272 e 408 pb, e o GG, pelas bandas 136 e 272 pb (Figura 10).

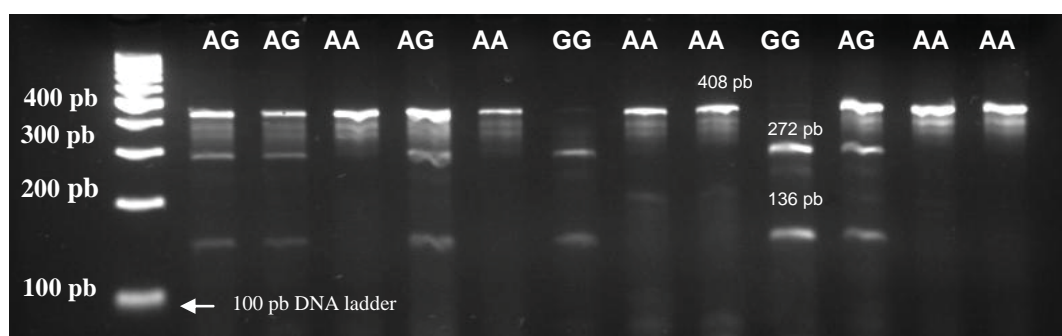


Figura 10 – Padrões de migração encontrados pela técnica de PCR-RFLP, representando as três classes genóticas, AA, AG e GG, para o polimorfismo 161A/G no gene do hormônio da grelina em Búfalos (*B. bubalis*).

Para a enzima *Bcl*I, utilizada para caracterizar o polimorfismo 419T/C, através da análise pelo webcutter esperava-se 3 padrões de bandas, um de 97 pb, que não pode ser visualizado, um de 184 pb e outro de 281 pb. O genótipo CC caracterizou-se pela banda 281 pb, o genótipo TC pelas bandas 97, 185 e 281 pb, e o TT, pelas bandas 97 e 184 pb (Figura 11).

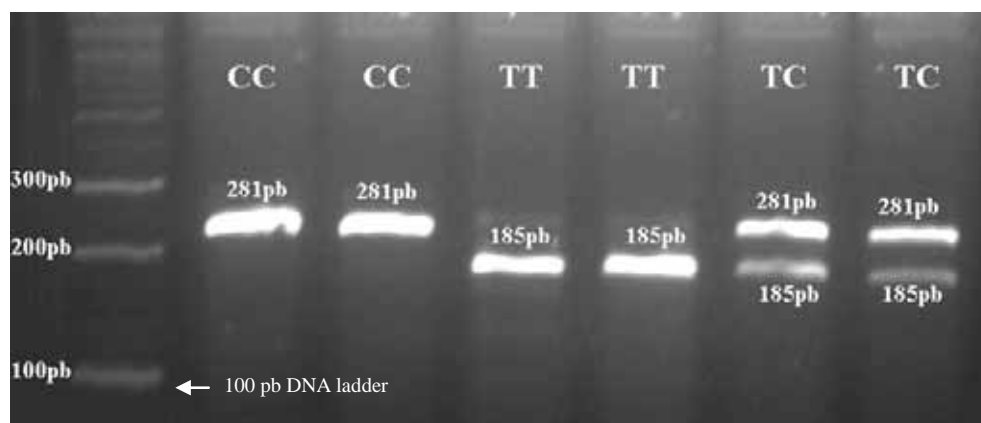


Figura 11 – Padrões de migração encontrados pela técnica de PCR-RFLP, representando as três classes genotípicas, TT, TC e CC, para o polimorfismo 419T/C no gene do hormônio da grelina em Búfalos (*B. bubalis*).

Para a enzima *MspI*, utilizada para caracterizar o polimorfismo 1631T/C, através da análise pelo webcutter esperava-se 5 padrões de bandas, 25, 29, 106, 135 e 242 pb. As bandas de 25 e 29 pb não podem ser visualizadas. O genótipo CC caracterizou-se pelas bandas 25, 29, 106 e 242 pb, o genótipo TC pelas bandas 25, 29, 106, 135 e 242 pb, e o TT, pelas bandas 25, 135 e 242 pb (Figura 12).

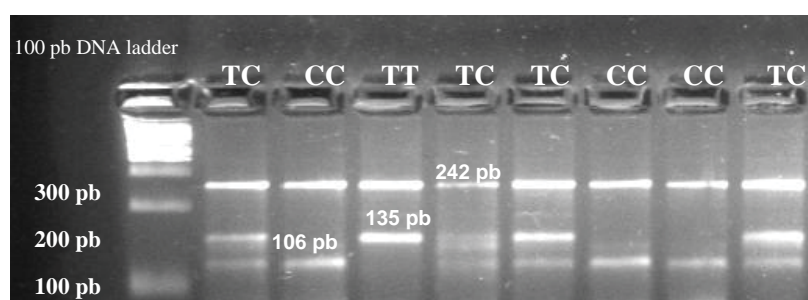


Figura 12 - Padrões de migração encontrados pela técnica de PCR-RFLP, representando as três classes genotípicas, TT, TC e CC, para o polimorfismo 1631T/C no gene do hormônio da grelina em Búfalos (*B. bubalis*).



Para a enzima *Nco*I, utilizada para caracterizar o polimorfismo 1479T/C, através da análise pelo webcutter esperava-se 3 padrões de bandas, um de 197 pb, um de 205 pb e outro de 402 pb. As bandas 197 e 205 pb aparecem sobrepostas por serem próximas uma da outra. O genótipo TT caracterizou-se pelas bandas 197 e 205 pb, o genótipo TC pelas bandas 197, 205 e 402 pb, e o CC, pela banda 402 pb (Figura 13).

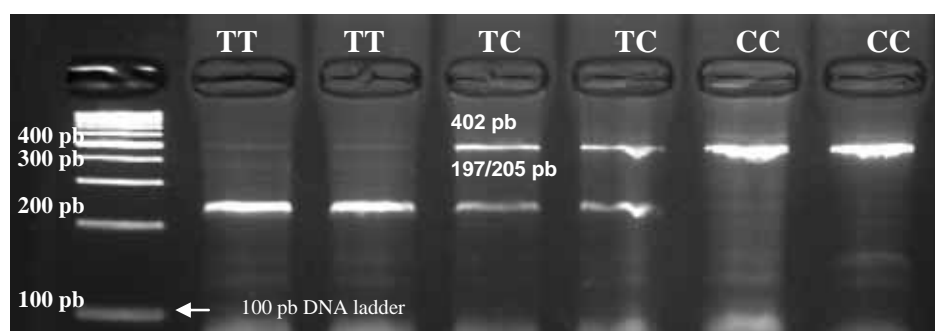


Figura 13 – Padrões de migração encontrados pela técnica de PCR-RFLP, representando as três classes genotípicas, TT, TC e CC, para o polimorfismo 1479T/C no gene do hormônio da grelina em Búfalos (*B. bubalis*).

Para a enzima *Pci*I, utilizada para caracterizar o polimorfismo 1449A/G, através da análise pelo webcutter esperava-se 3 padrões de bandas, um de 52 pb, que não pode ser visualizado, um de 350 pb e outro de 402 pb. O genótipo AA caracterizou-se pelas bandas 52 e 350 pb, o genótipo GA pelas bandas 52, 350 e 402 pb, e o GG, pela banda 402 pb (Figura 14).

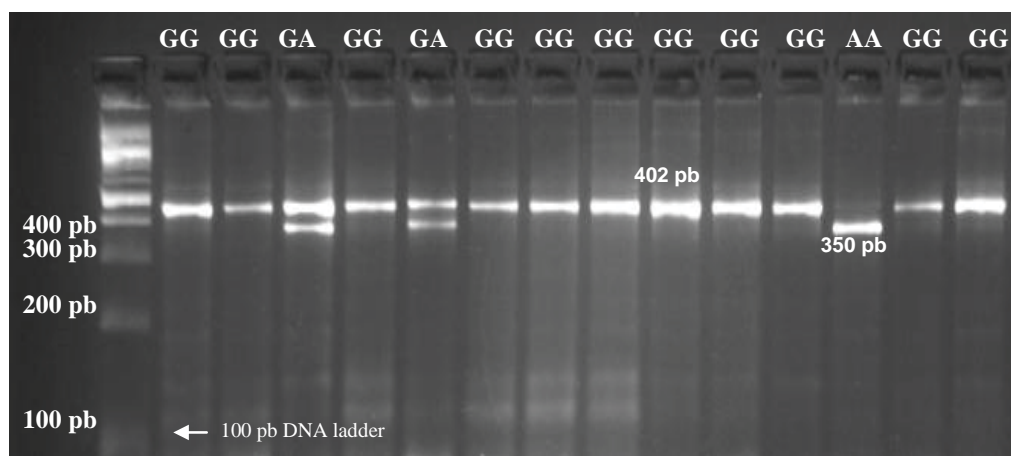


Figura 14 – Padrões de migração encontrados pela técnica de PCR-RFLP, representando as três classes genotípicas, GG, GA e AA, para o polimorfismo 1449A/G no gene do hormônio da grelina em Búfalos (*B. bubalis*).

Para a enzima *Tsp45I*, utilizada para caracterizar o polimorfismo 1576T/C, através da análise pelo webcutter esperava-se 3 padrões de bandas, um de 167 pb, que não pode ser visualizado, um de 235 pb e outro de 402 pb. O genótipo CC caracterizou-se pelas bandas 167 e 235 pb, o genótipo TC pelas bandas 167, 235 e 402 pb, e o TT, pela banda 402 pb (Figura 15).

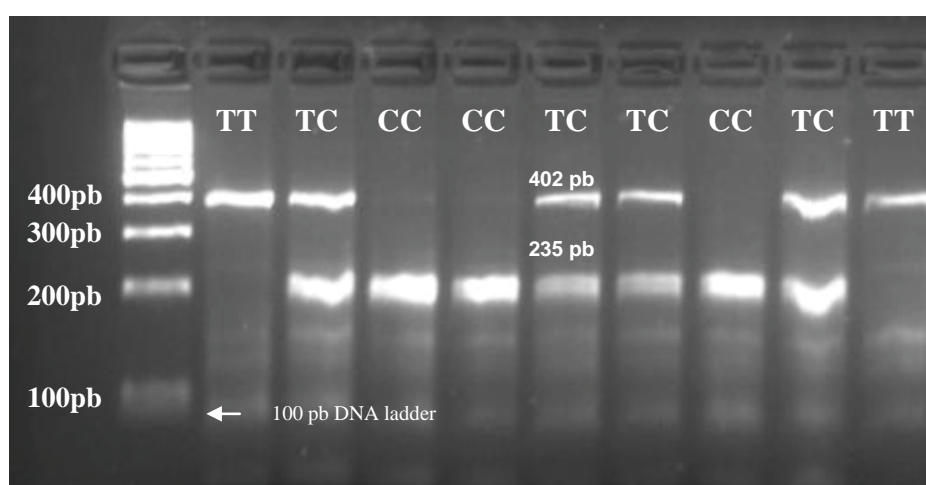


Figura 15 – Padrões de migração encontrados pela técnica de PCR-RFLP, representando as três classes genotípicas, TT, TC e CC, para o polimorfismo 1576T/C no gene do hormônio da grelina em Búfalos (*B. bubalis*).

Para a enzima *HinfI*, utilizada para caracterizar o polimorfismo 3564T/C, através da análise pelo webcutter esperava-se 3 padrões de bandas, um de 85 pb, que não pode ser visualizado, um de 363 pb e outro de 402 pb. O genótipo CC caracterizou-se pelas bandas 85 e 363 pb, o genótipo TC pelas bandas 85, 363 e 402 pb, e o TT, pela banda 402 pb (Figura 16).

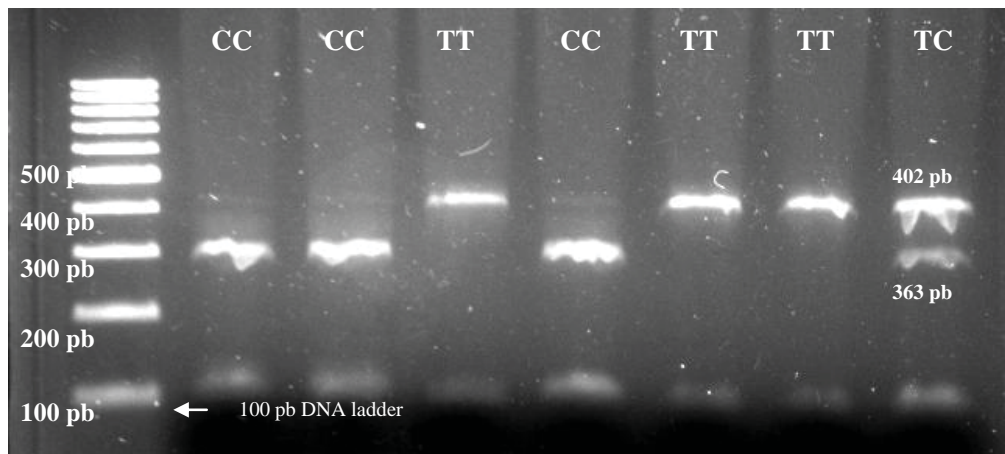


Figura 16 - Padrões de migração encontrados pela técnica de PCR-RFLP, representando as três classes genotípicas, CC, TC e TT, para o polimorfismo 3564T/C no gene do hormônio da grelina em Búfalos (*B. bubalis*).

Para a enzima *Tsp45I*, utilizada para caracterizar o polimorfismo 3565A/G, através da análise pelo webcutter esperava-se 3 padrões de bandas, um de 76 pb, que não pode ser visualizado, um de 359 pb e outro de 402 pb. O genótipo GG caracterizou-se pelas bandas 76 e 359 pb, o genótipo GA pelas bandas 76, 359 e 402 pb, e o AA, pela banda 402 pb (Figura 17).

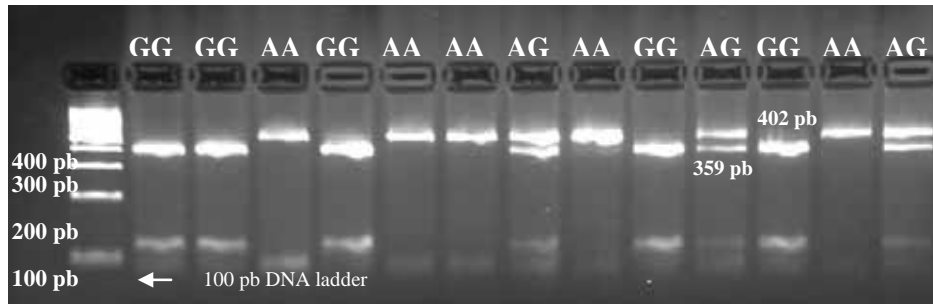


Figura 17 - Padrões de migração encontrados pela técnica de PCR-RFLP, representando as três classes genóticas, AA, AG e GG, para o polimorfismo 3565A/G no gene do hormônio da grelina em Búfalos (*B. bubalis*).

## 5.4 Análise Genética e Estatística

### 5.4.1 Frequências Alélica e Genotípica

### 5.4.2 Teste de aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg

A Tabela 4 apresenta o número de animais analisados, as frequências alélicas e genotípicas observadas, as frequências genotípicas esperadas segundo o equilíbrio de H-W e o  $\chi^2_{obs}$  para os polimorfismos encontrados para os iniciadores 1, 2, 3 e 5.

Tabela 4: Número de animais analisados, frequência alélica, frequência genotípica observada, frequência genotípica esperada segundo o equilíbrio de H-W e valores do teste do  $\chi^2_{obs}$  para os polimorfismos encontrados para os iniciadores 1, 2, 3 e 5.

SNP**	Enzima de restrição utilizada para genotipagem	Número de animais analisados	Frequência alélica	Frequência genotípica observada	Frequência genotípica esperada segundo o equilíbrio de H-W.	$\chi^2_{obs}$ *
161A/G	<i>Bst</i> UI	230	A = 0,60 G = 0,40	AA = 0,36 (82) AG = 0,48 (110) GG = 0,16 (38)	AA = 0,36 (82) AG = 0,48 (110) GG = 0,16 (38)	0,0117
419T/C	<i>Bcl</i> I	240	T = 0,45 C = 0,55	TT = 0,21 (50) TC = 0,48 (115) CC = 0,31 (75)	TT = 0,20 (48) TC = 0,50 (119) CC = 0,30 (73)	0,2329
1631T/C	<i>Msp</i> I	237	T = 0,30 C = 0,70	TT = 0,05 (12) TC = 0,51 (121) CC = 0,44 (104)	TT = 0,09 (22) TC = 0,42 (101) CC = 0,49 (114)	9,6958*
1479T/C	<i>Nco</i> I	238	T = 0,44 C = 0,56	TT = 0,16 (37) TC = 0,56 (134) CC = 0,28 (67)	TT = 0,19 (45) TC = 0,49 (117) CC = 0,32 (76)	4,9510*
1449A/G	<i>Pci</i> I	236	A = 0,11 G = 0,89	AA = 0,02 (4) AG = 0,18 (43) GG = 0,80 (189)	AA = 0,01 (3) AG = 0,19 (45) GG = 0,80 (188)	0,7068
1576T/C	<i>Tsp</i> 45I	241	T = 0,49 C = 0,51	TT = 0,23 (54) TC = 0,51 (124) CC = 0,26 (63)	TT = 0,23 (56) TC = 0,50 (120) CC = 0,27 (65)	0,2239
3564T/C	<i>Hinf</i> I	215	T = 0,54 C = 0,46	TT = 0,24 (52) TC = 0,60 (128) CC = 0,16 (35)	TT = 0,29 (63) TC = 0,50 (107) CC = 0,21 (45)	8,4449*
3565A/G	<i>Tsp</i> 45I	208	A = 0,53 G = 0,47	AA = 0,26 (53) AG = 0,53 (111) GG = 0,21 (44)	AA = 0,27 (57) AG = 0,50 (104) GG = 0,23 (47)	0,9992

Os valores entre parênteses correspondem ao número de animais para cada genótipo identificado

\*  $\chi^2_{obs}$  : Qui-Quadrado observado, valores maiores do que 3,84 são significativos ( $p \leq 0,05$ )

\*\*SNP: *Single nucleotide polymorphism*

O valor de  $p$  ao nível de 5 % de significância é de 3,84. Para a maioria dos polimorfismos analisados segundo a tabela 5, as frequências aderem ao equilíbrio de H-W, ou seja, a população está em equilíbrio e isso pode ser indicativo de que a seleção para produção de leite nos bubalinos, para estes polimorfismos, não interfira nas frequências alélicas encontradas. Com exceção dos polimorfismos 1631T/C, 1479T/C e 3564T/C em que  $\chi^2_{obs} > \chi^2_t$ .

### 5.4.3 Desequilíbrio de Ligação

Na Tabela 5, encontram-se os valores estimados de  $r^2$  entre os oito SNPs genotipados na população.

Tabela 5. Valores estimados de  $r^2$  para os oito SNPs encontrados no gene da grelina.

SNP**	161A/G	419T/C	1631T/C	1479T/C	1449A/G	1576T/C	3564T/C
<b>161A/G</b>	-	-	-	-	-	-	-
<b>419T/C</b>	0,296	-	-	-	-	-	-
<b>1631T/C</b>	0,010	0,013	-	-	-	-	-
<b>1479T/C</b>	0,447	0,592	0,041	-	-	-	-
<b>1449A/G</b>	0,083	0,156	0,034	0,097	-	-	-
<b>1576T/C</b>	0,503	0,635	0,050	0,806	0,073	-	-
<b>3564T/C</b>	0,275	0,323	0,043	0,544	0,096	0,463	-
<b>3565A/G</b>	0,511	0,613	0,031	0,671	0,060	0,757	0,468

\*  $r^2$ : Desequilíbrio de ligação

\*\*SNP: *Single nucleotide polymorphism*

Considerou-se que se o  $r^2$  for maior que 0,33, o desequilíbrio de ligação é forte (ARDLIE et al., 2002). Os valores de  $r^2$  variaram de 0,010 a 0,806. Os SNPs 1631T/C e 1449T/C apresentaram valores de  $r^2$  menores que 0,33, com todos os demais SNPs e entre si, significando que estão em equilíbrio de ligação e que são herdados separadamente. Os SNPs 1479T/C, 1576T/C, 3564T/C e 3565A/G apresentaram

valores maiores que 0,33 entre si, para o  $r^2$ , significando que estes SNPs estão em desequilíbrio de ligação e que são herdados juntos. Os SNPs 161A/G e 419T/C apresentaram valores altos de  $r^2$  com alguns SNPs do grupo anterior, porém não com todos. Apesar disso, como os valores de  $r^2$  eram próximos de 0,33, eles foram considerados todos no mesmo grupo, obtendo uma explicação biológica mais plausível. De acordo com estes resultados consideraram-se três grupos de SNPs para cálculo de análises de associação: o grupo 1, contendo o SNP 1631T/C; o grupo 2, constituído pelos SNPs 161A/G, 419T/C, 1479T/C, 1576T/C, 3564T/C e 3565A/G; e o grupo 3, contendo o SNP 1449A/G.

#### 5.4.4 Análises de associação entre os polimorfismos e as características de produção e qualidade do leite

As análises de associação foram realizadas entre os três grupos considerados anteriormente, sendo que, para o grupo 2, escolheu-se o SNP 1576T/C para os cálculos por apresentar uma melhor distribuição de frequências genotípicas. Esses grupos de SNPs foram correlacionados com as características produção de leite, gordura e proteína e porcentagens de gordura e proteína.

A Tabela 6 mostra os valores nominais de  $P$  e as médias das produções para as características em estudo para o grupo 1 de SNP.

Tabela 6: Médias das produções para as características produção de leite, gordura e proteína e porcentagens de gordura e proteína no leite e, valores nominais de  $P$ , para o grupo 1, formado pelo SNP\* 1631T/C.

Genótipo	PL (kg) ( $P=0,1670$ )	PG (kg) ( $P=0,0068$ )	PP (kg) ( $P=0,4975$ )	%G ( $P=0,1107$ )	%P ( $P=0,8255$ )
TT	1592,49	111,96 b	67,79	7,14	4,32
TC	1527,22	105,56 b	65,99	7,10	4,32
CC	1525,43	101,59 a	65,76	6,93	4,34

\*SNP: *Single nucleotide polymorphism*

PL = produção de leite; PG = produção de gordura; PP = produção de proteína; %G = porcentagem de gordura; %P = porcentagem de proteína.

\*\*médias seguidas de pelo menos uma mesma letra não são significativamente diferentes (Teste de Tukey, 5%)

De acordo com a Tabela 6, pode-se observar que houve associação deste polimorfismo com a característica produção de gordura, ao nível de significância de 5%. O genótipo TT foi o que apresentou a maior média de produção para a característica em estudo, seguido pelo genótipo TC. E, o genótipo CC foi o que apresentou a menor média.

A Tabela 7 mostra os valores nominais de *P* e as médias das produções para as características em estudo para o grupo 2 de SNPs.

Tabela 7: Médias das produções para as características produção de leite, gordura e proteína e porcentagens de gordura e proteína no leite e, valores nominais de *P*, para SNP\* 1576T/C que faz parte do grupo 2.

Genótipo	PL (kg) ( <i>P</i> =0,3411)	PG (kg) ( <i>P</i> =0,0213)	PP (kg) ( <i>P</i> =0,5161)	%G ( <i>P</i> =0,0178)	%P ( <i>P</i> =0,0402)
TT	1545,71	107,84 b	66,81	7,18 b	4,34 ab
TC	1524,85	102,94 a	65,93	6,99 ab	4,35 b
CC	1545,15	102,18 a	65,79	6,87 a	4,29 a

\*SNP: *Single nucleotide polymorphism*

PL = produção de leite; PG = produção de gordura; PP = produção de proteína; %G = porcentagem de gordura; %P = porcentagem de proteína.

\*\*médias seguidas de pelo menos uma mesma letra não são significativamente diferentes (Teste de Tukey, 5%)

De acordo com os resultados, ao nível de significância de 5%, houve associação deste SNP com as características produção de gordura e porcentagens de gordura e proteína. O genótipo TT foi o que apresentou maior produção de gordura e, diferiu estatisticamente dos outros dois genótipos. Para a característica porcentagem de gordura, os genótipos que apresentaram maiores médias de produção foram o TT e o TC, sendo que estes não diferiram estatisticamente entre si. O genótipo TT apresentou maior média para produção de gordura e porcentagem de gordura, sem contudo diminuir a média para produção de leite.

Já para a característica porcentagem de proteína, os três genótipos apresentaram valores de médias semelhantes, pois, embora tenha ocorrido associação desta característica com o SNP 1576T/C, esta foi baixa.



A Tabela 8 mostra os valores nominais de *P* e as médias de produções para as características em estudo para o grupo 3 de SNP.

Tabela 8: Médias das produções para as características produção de leite, gordura e proteína e porcentagens de gordura e proteína no leite e, valores nominais de *P*, para o grupo 3, formado pelo SNP\* 1449A/G.

Genótipo	PL (kg) ( <i>P</i> =0,2105)	PG (kg) ( <i>P</i> =0,0164)	PP (kg) ( <i>P</i> =0,0832)	%G ( <i>P</i> =0,1456)	%P ( <i>P</i> =0,3881)
GG	1537,65	104,36 a	66,37	7,02	4,34
AG	1522,47	102,01 a	65,62	6,97	4,33
AA	1447,42	88,06 b	60,79	6,43	4,23

\*SNP: *Single nucleotide polymorphism*

PL = produção de leite; PG = produção de gordura; PP = produção de proteína; %G = porcentagem de gordura; %P = porcentagem de proteína.

\*\*médias seguidas de pelo menos uma mesma letra não são significativamente diferentes (Teste de Tukey, 5%)

Dentre as características estudadas, a produção de gordura foi a que apresentou associação com o SNP analisado. Os genótipos GG e AG não apresentaram diferenças significativas entre si e corresponderam às maiores médias de produção da característica produção de gordura. Já o genótipo AA foi o que apresentou menor média de produção.

Também foi realizado um teste de análise de varância dos genótipos para o SNP 419T/C, o único encontrado numa região de éxon, com o intuito de prosseguir com análises de efeito de substituição caso houvesse significância. Os resultados encontram-se na Tabela 9.

Tabela 9: Médias das produções para as características produção de leite, gordura e proteína e porcentagens de gordura e proteína no leite e, valores nominais de *P*, para o SNP\* 419T/C.

Genótipo	PL (kg) ( <i>P</i> =0,0559)	PG(kg) ( <i>P</i> =0,1496)	PP(kg) ( <i>P</i> =0,0965)	%G ( <i>P</i> =0,1632)	%P ( <i>P</i> =0,1089)
CC	1626,69 ± 62,07	99,62 ± 4,63	70,87 ± 2,77	6,29 ± 0,22	4,36 ± 0,07
TC	1554,15 ± 49,92	91,93 ± 3,70	66,26 ± 2,21	6,01 ± 0,17	4,29 ± 0,05
TT	1470,39 ± 55,72	90,51 ± 4,15	64,52 ± 2,48	6,38 ± 0,19	4,43 ± 0,06

\*SNP: *Single nucleotide polymorphism*

PL = produção de leite; PG = produção de gordura; PP = produção de proteína; %G = porcentagem de gordura; %P = porcentagem de proteína.

Os resultados não foram significativos para todos os genótipos. Portanto, não foi possível avaliar o efeito de substituição alélica.

Trabalhos relacionados a polimorfismos no gene da grelina são escassos na literatura ou mesmo trabalhos de associação entre a grelina e produções de leite e seus constituintes. Neste estudo, os SNPs que apresentaram associação com as características em estudo, situam-se em regiões não codificantes do DNA, ou seja, localizam-se nos íntrons. Fragmentos intrônicos são importantes para a biologia celular e podem estar relacionados ao estágio de desenvolvimento de um câncer, por exemplo (REIS et al., 2004).

NAKAYA et al. (2007) realizaram uma pesquisa sobre o genoma humano e atribuíram uma grande importância aos íntrons. Sugeriram que grande parte dos íntrons produzem RNAs não-codificadores de proteínas que ajudam a regular a maioria dos genes codificadores de proteínas e indicam que esses RNAs não-codificadores podem constituir mais um fator que determina as diferenças entre os diversos tecidos humanos. Os autores analisaram milhares de genes em bancos de dados públicos e verificaram que, dos íntrons inseridos em 74% de todos os genes humanos que codificam proteínas, se originam mais de 55 mil fragmentos de RNAs não-codificadores. Também, mediram diretamente a expressão de mais de sete mil desses RNAs não-codificadores, e verificaram padrões na expressão deles entre células de rim, fígado e próstata. Os pesquisadores também observaram que os RNAs intrônicos podem contribuir no controle das proteínas que regulam a transcrição do DNA em RNA. Essas proteínas se ligam no DNA e regulam a atividade da enzima que faz a transcrição (RNA-polimerase II) e são conhecidas como "fatores de transcrição" e "zinc-finger". Isso ocorre porque os fragmentos de íntrons mais ativos, isto é, aqueles que geraram RNAs não-codificadores mais abundantes, estão inseridos dentro dos genes que codificam a produção destas proteínas regulatórias. Inclusive, os dois tipos de RNAs devem ser sintetizados por enzimas diferentes, pois a quantidade dos intrônicos aumenta quando é inibida a RNA polimerase II.

Estudos realizados com câncer de próstata humana demonstraram que mais da metade dos íntrons produzem transcritos que interferem com a expressão de proto-oncogenes. Essa modulação, quando de alguma forma é alterada, pode contribuir para o desenvolvimento de um tumor (REIS et al., 2004).

TANPURE et al. (2012) estudaram o gene da leptina em Búfalos e encontraram SNP que apresentou valor significativo de associação com a característica porcentagem de gordura aos 150 dias. Este SNP identificado estava numa região intrônica. Este resultado foi similar com os resultados do presente estudo onde, os SNPs de regiões intrônicas apresentaram correlações com características de qualidade de leite.

Diante destes resultados, supõe-se que possa haver alguma relação destes SNPs identificados nas regiões não codificadoras do DNA e características de composição do leite como, produção e porcentagem de gordura e proteína no leite. Sugere-se que estudos futuros sejam realizados como intuito de verificar a implicação dos íntrons na qualidade do leite produzido.

## 6. CONCLUSÕES

- Em Búfalos, foram identificados 8 SNPs no gene da Grelina.
- Os SNPs 1631T/C e 1449A/G apresentaram associação com a característica produção de gordura. E, o SNP 1576T/C, apresentou correlação com as características produção de gordura e porcentagens de gordura e proteína. Todos, ao nível de significância de 5%.
- Sugere-se que estes SNPs podem ser utilizados como marcadores moleculares em Seleção assistida por marcadores em Búfalos, mas ressalta-se que estudos posteriores a fim de caracterizar outras regiões de interesse no mesmo gene são importantes.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, S. A. A.; BERNARDES, O.; ROSSATO, C. Avaliação da produção leiteira de búfalas na região sudoeste de São Paulo. **Bol Búfalo ABCB**, n. 1, p. 38, 2004.

BASSAN, B. J.; ANOLLÉS, G. C.; GRESSHOFF, P. M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrilamide gels. **An. Biochem.**, v.196, p. 80-83, 1991.

BEDNAREK, M. A.; FEIGHNER, S. D.; PONG, S. S.; MCKEE, K. K.; HRENIUK, D. L.; SILVA, M. V.; WARREN, V. A.; HOWARD, A. D.; VAN DER PLOEG, L. H.; HECK, J. V. Structure-function studies on the new growth hormone-releasing peptide, ghrelin: Minimal sequence of ghrelin necessary for activation of growth hormone secretagogue receptor 1a. **J. Med. Chem.**, v. 43, n.23, p. 4370–4376, 2000.

BERNARDES, O. Bubalinocultura no Brasil: situação e importância econômica. **Rev Bras Reprod Anim.**, Belo Horizonte, v. 31, n. 3, p. 293-298, jul./set. 2007.

COLINET, F. G.; PORTETELLE, D.; RENVILLE, R. Molecular characterization of the bovine GHRL gene. **Arch. Tierzucht.**, v. 52, p. 70-84, 2009.

DATE, Y.; KOJIMA, M.; HOSODA, H.; SAWAGUCHI, A.; MONDAL, M. S.; SUGANUMA, T. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rat and human. **Endocrinology.**, Chervychase, v. 141, n. 11, p. 4255-4261, 2000.

HASHIZUME, T.; HORIUCHI, M.; NONAKA, S.; KASUYA, E.; KOJIMA, M.; HOSODA, H.; KANGAWA, K. Effects of ghrelin on growth hormone secretion in vivo in ruminants. **Regul. Pept.**, Amsterdam, v. 126, n. 1-2, p. 61–65, 2005.

HAYASHIDA, T.; MURAKAMI, K.; MOGI, K.; NISHIHARA, M.; NAKAZATO, M.; MONDAL, M. S. Ghrelin in domestic animals: distribution in stomach and its possible role. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v. 21, n. 1, p. 17–24, 2001.

HILL, H. G. Estimation of effective population size from data on linkage disequilibrium. **Genetical Research**, v. 38, p. 209-216, 1981.

HILL, H. G.; ROBERTSON, A. The effect of linkage on limits to artificial selection. **Genetical Research**, v. 8, p. 269-294, 1966.

ITOH, F.; KOMATSUA, T.; YONAIB, M.; SUGINOC, T.; KOJIMAD, M.; KANGAWAD, K.; HASEGAWAC, Y.; TERASHIMAC, Y.; HODATEC, K. GH secretory responses to ghrelin and GHRH in growing and lactating dairy cattle. **Domest. Anim. Endocrinol.**, Philadelphia, v. 28, n. 1, 2005, p. 34-45, 2005.

KOJIMA, M.; HOSODA, H.; DATE, Y. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. **Nature**, London, v. 402, p. 656-660, 1999.

KOWALEWSKA-ŁUCZAK, I.; SZEMBEK, M.; KULIG, H. Ghrelin gene polymorphism in dairy cattle. **Journal of Central European Agriculture**, v. 12, n. 4, p. 744-751, 2011.

MARTINEZ, M. L.; MACHADO, M. A. Programa genoma brasileiro de bovinos e suas perspectivas de aplicações práticas. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE MELHORAMENTO ANIMAL, 4., 2002, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: 2002.

MIURA, H.; TSUCHIYA, N.; SASAKI, I.; KIKUCHI, M.; KOJIMA, M.; KANGAWA, K.; HASEGAWA, Y.; OHNAMI. Changes in plasma ghrelin and growth hormone concentrations in mature Holstein cows and three-month-old calves. **J. Anim. Sci.**, v. 82, p. 1329-1333, 2004.

MULLIS, K. B. The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. **Scientific American**, p.56-65, 1990.

NAKAZATO, M.; MURAKAMI, N.; DATE, Y.; KOJIMA, M.; MATSUO, H.; KANGAWA K. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. **Nature**, v. 409, p. 194-198, 2001.

ORITA, M.; SUSUKI, Y.; SEKIYA, T.; HAYASHI, K. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. **Genomics**, San Diego, v. 5, p. 874-879, 1989.

PEREIRA, J. C. C. **Melhoramento Genético aplicado à produção animal**. 5. ed., Belo Horizonte: FEPMVZ Editora, 2008, 617p.

RAMOS, A. A.; WECHSLER, F. S.; GONÇALVES, H. C. Phenotypic, genetic and environmental trends of milk yield from brazilian buffalo cows. In: World Buffalo Congress, 7., 2005, Manilla. **Proceedings**... Manilla: WBC, 2005. p.175-177.

REIS, E. M.; NAKAYA, H. I.; LOURO, R.; CANAVEZ, F. L.; FLATSCHART, A. V. F.; ALMEIDA, G. T.; EGIDIO, C. M.; PAQUOLA, A. C.; MACHADO, A. A.; FESTA, F.; YAMAMOTO, D.; ALVARENGA, R.; SILVA, C. C.; BRITO, G. C.; SIMON, S. D.; MOREIRA-FILHO, C. A.; LEITE, K. R.; CAMARA-LOPES, L. H.; CAMPOS, F. S.; GIMBA, E.; VIGNAL, G. M.; EL-DORRY, H.; SOGAYAR, M. C.; BARCINSKI, M. A.; SILVA, A. M.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S. Antisense intronic non-coding RNA levels correlate to the degree of tumor differentiation in prostate cancer. **Oncogene**, London, v. 23, n. 39, p. 6684-6692, 2004.

ROCHE, J. R.; SHEAHAN, A. J.; CHAGAS, L. M.; BERRY, D. P. Genetic selection for milk production increases Plasma Ghrelin in dairy cows. **J. Dairy Sci.**, v. 89, p. 3471-3475, 2006.

ROMERO, C. E. M.; ZANESCO, A. O papel dos hormônios leptina e grelina na gênese da obesidade. **Rev. Nutr.**, v. 19, n. 1, 2006.

ROSICKÁ, M.; KRSEK, M.; MATOULEK, M.; JARKOVSKÁ, Z.; MAREK, J.; JUSTOVÁ, V.; LACINOVÁ, Z. Serum ghrelin levels in obese patients: the relationship to serum leptin levels and soluble leptin receptors levels. **Physiol Res.**, v. 52, n. 1, p. 61-66, 2003.

SAMBROOK, J.; FRITSH, E. F.; MANIATS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. 564 p.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SAS INSTITUTE INC. User's guide. SAS Institute Inc., Cary, 2000.

SEJRSEN, K.; PURUP, S.; VESTERGAARD, M.; WEBER, M. S.; KNIGHT, C. H. Growth hormone and mammary development. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v. 17, p. 117–129, 1999.

SUN, J.; JIN, Q.; ZHANG, C.; FANG, X.; GU, C.; LEI, C.; WANG, J.; CHEN, H. Polymorphisms in the bovine ghrelin precursor (GHRL) and Syndecan-1 (SDC1) genes that are associated with growth traits in cattle. **Mol. Biol. Rep.**, v. 38, p. 3153–3160, 2011.

TANPURE, T.; DUBEY, P. K.; SINGH, K. P.; KATHIRAVAN, P.; MISHRA, B. P.; NIRANJAN, S. K.; KATARAIA, R. S. PCR-SSCP analysis of leptin gene and its association with milk production traits in river buffalo (*Bubalus bubalis*). **Trop Anim Health Prod**, 2012.



TONHATI, H.; ALBUQUERQUE, L. G.; OLIVEIRA, J. F. S.; BARUSELLI, P. S. Melhoramento genético em bubalinos. Programa Vale do Ribeira, SP. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE MELHORAMENTO GENÉTICO ANIMAL, 1., 1996, Ribeirão Preto. **Anais...**Ribeirão Preto, 1996. p.69-72.

TONHATI, H.; MUÑOZ, M. F. C.; OLIVEIRA, J. A.; DUARTE, J. M. C.; FURTADO, T. P.; TSEIMAZIDES, S. P. Parâmetros genéticos para a produção de leite, gordura e proteína em bubalinos. **R. Bras. Zootec.** Viçosa, v. 29, n. 6, p. 2051-2056, 2000.

TONHATI, H.; MENDONZA-SANCHES, G.; SESANA, B. C.; ALBUQUERQUE, L. G. Programa de Mejoramiento Genético de Búfalos Lecheros en el Brasil. In: SIMPÓSIO DE BÚFALOS DE BÚFALOS DAS AMÉRICAS, 3., 2006, Medellín. **Prodeeding...** Editora, 2006. p. 115-122.

VALENTE, J.; DURÃES, M. C.; MARTINEZ, L. M.; TEIXEIRA, N. M. **Melhoramento genético de bovinos de leite. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite**, 2001, 256 p.

WAJNRAJCH, M. P.; TEN, I. S.; GERTNER, J. M.; LEIBEL, R. L. Genomic organization of the ghrelin gene. **J. Endo Gen.**, p. 231–233, 2001.