

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

ANÁLISE DE POLIMORFISMO NO GENE DA LEPTINA EM
BOVINOS DA RAÇA BRAFORD

Larissa Carvalho Tavares

Florianópolis

Julho/2014

Larissa Carvalho Tavares

**ANÁLISE DE POLIMORFISMO NO GENE DA LEPTINA EM
BOVINOS DA RAÇA BRAFORD**

Relatório de estágio apresentado ao curso de Graduação em Agronomia, do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para a obtenção do título de Engenheiro Agrônomo.

Orientador e supervisor: Prof. Dr. André Luís Ferreira Lima.

Local de estágio: Laboratório de Ensino e Pesquisa em Genética Animal da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis - SC

2014

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida que me concedestes e a oportunidade de ter chegado até aqui.

A minha mãe Nilcéia Carvalho, meus irmãos Lahys e Leandro que sempre me incentivaram para que eu nunca desistisse ao longo desta trajetória dando muito amor, força, equilíbrio e sabedoria.

Ao meu Pai Marcio Pacheco Tavares *in memoriam* por seu espírito de luz sempre me acompanhar a cada decisão.

Ao meu namorado Gabriel Paschoal pelo companheirismo, paciência, carinho, amor, motivação e confiança.

A todos meus amigos, professores e colegas em especial a turma 2009.2 que contribuíram para minha formação acadêmica, profissional e pessoal.

Agradeço em especial ao Professor André Murotte por sempre me incentivar e apostar em meus sonhos, aceitando me orientar e ter repassado seus conhecimentos, além da amizade formada.

Agradeço também ao professor Sérgio Quadros pela sua fundamental contribuição para a realização deste trabalho.

Ao Eng. Agr. Rafael Becker Momm proprietário da Fazenda Meia Lua, pela oportunidade concedida, presteza e conhecimentos repassados. Assim como seus colaboradores Aécio dos Anjos, Carlos Humberto, Francisco Osvaldo Farias e Veridiano Ozote por toda dedicação e trabalho.

Agradeço a Universidade Federal de Santa Catarina e seus servidores que contribuíram durante a graduação e na realização deste trabalho.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fazenda Meia Lua.....	17
Figura 2. Coleta dos folículos pilosos.....	18
Figura 3. Processamento das amostras.....	18
Figura 4. Incubadora a banho.....	19
Figura 5. Nanodrop 1000.....	19
Figura 6. Termociclador Real Time	20
Figura 7. Cuba de eletroforese.....	20
Figura 8. Imagem representativa dos resultados obtidos no procedimento de extração do DNA genômico das amostras. Gel de agarose a 0,5%.....	21
Figura 9. Imagem representativa dos resultados obtidos após a PCR. Gel de agarose a 1,5%. A=Marcador de peso molecular 1kb plus DNA ladder (Invitrogen).....	22
Figura 10. Exame de toque retal.....	23
Figura 11. Manejo de desmame.....	24
Figura 12. Animais em confinamento.....	25
Figura 13. Touro selecionado.....	26
Figura 14. Animais comercializados em leilão.....	27

RESUMO - Os marcadores moleculares em programas de seleção são complementares a seleção clássica, sua utilização permite a antecipação das avaliações nos animais, otimizando o sistema de seleção genética voltada a produção animal. O hormônio leptina e seus receptores são expressos principalmente nos adipócitos e relacionados ao controle da ingestão de alimentos, uso da energia e indicador da condição nutricional do organismo que influenciam em ações de outros sistemas fisiológicos. O presente estudo tem como objetivo verificar a possível existência de polimorfismos em uma região do gene da Leptina em 29 bovinos da raça Braford. O DNA genômico foi extraído de amostras de pelos coletados da vassoura da cauda dos animais. Os resultados obtidos com os procedimentos de extração do DNA foram bastante satisfatórios, onde todas as amostras apresentaram concentração igual ou superior a 100 ng/ uL. Entretanto, os resultados obtidos na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com o par de iniciadores utilizado neste estudo não foram eficientes, indicando a necessidade de maiores ajustes para viabilização do isolamento e amplificação da região de interesse do gene da Leptina antes de realizar a etapa de Análise de Polimorfismo do Tamanho do Fragmento de Restrição (RFLP).

Palavras-chave: Marcadores moleculares; Polimorfismo; Leptina; Braford

ABSTRACT - With the technology of Molecular Marked Assisted Selection genetic evaluations and progress of classic traits can be improved. The Leptin hormone and its receptors are expressed mainly in adipocytes and have a important role on ingestion control, energy metabolism and corporal conditions of animals. The present study was carried on intent to verify the possibly existence of genetic polymorphisms in structural region of Leptin`s gene from 29 animal of Braford breed. The genomic DNA was extracted from samples of hairs from animals tails. The results obtained with DNA extraction procedures were satisfactory, with samples showing concentration levels from 100 ng/UL. However, the results obtained in the Polymerase Chain Reaction (PCR) with primers designed to this study, indicating the necessity of further studies to adjust these step, permitting the isolation and amplification of leptin gene before the application in the Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) to verify the existence of polymorphisms.

Keywords: Molecular markers; Polymorphism; Leptin; Braford

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	III
LISTA DE FIGURAS	IV
RESUMO	5
ABSTRACT.	6
1. INTRODUÇÃO	8
2. OBJETIVOS	9
2.1. Objetivo Geral	9
2.2. Objetivos Específicos.....	9
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
3.1. Pecuária de corte e mercado.....	9
3.2. Raça Braford	11
3.3. Gene Leptina.....	11
3.4. Marcadores Moleculares	13
3.5. Polimorfismo no gene da leptina.....	14
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
4.1. Coleta de amostras e extrações de DNA genômico	16
4.2. Obtenção dos iniciadores e realização da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)	19
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
6. CONCLUSÃO	22
7. ATIVIDADES COMPLEMENTARES	23
7.1. Diagnóstico de gestação	23
7.2. Desmane dos bezerros.....	24
7.3. Pesagem de animais confinados	25
7.4. Seleção de reprodutores	26
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	27
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

1. INTRODUÇÃO

A bovinocultura brasileira iniciou juntamente com a colonização do país, através da introdução de espécimes oriundas da península ibérica. A atividade pecuária permitiu a expansão das fronteiras do Brasil e consolidação da então colônia. Estes animais de origem europeia (*Bos taurus*) foram criados de forma extrativista e empírica, que ao longo dos anos sofreram pressões principalmente do clima, levando a redução de seus desempenhos (EUCLIDES FILHO, 2009). De acordo com Alencar (2004), surgiram diferentes raças brasileiras através de misturas devido ao processo de adaptação destes animais e desenvolvimento do país. No início do século XIX, houve a introdução de raças Zebuínas (*Bos indicus*), sendo mais expressivo no século XX, onde havia a necessidade de animais mais resistentes e produtivos. Com isso, podemos marcar a primeira grande revolução na pecuária de corte brasileira.

A partir do século XX, iniciaram os programas com embasamento científico para orientação da melhoria genética. Na segunda metade do século ocorreram mudanças dentro da sociedade em relação aos alimentos e exigências nas dimensões econômicas, sociais, ambientais, culturais e políticas. Levando a uma complexidade da atividade pecuária, em busca da moderna linha de melhoramento genético para obter maiores eficiências no campo produtivo (EUCLIDES FILHO, 1999). Neste contexto, técnicas de reprodução vinculada ao melhoramento genético ganharam destaque nos sistemas de produção e atualmente a seleção genética vive uma nova fase, onde avaliação fenotípica é auxiliada pela avaliação genômica através do uso de ferramentas da genética molecular (GARCIA, 2006).

A utilização dos marcadores tem como propósito obter conhecimento das características de uma população, sua variabilidade e os padrões de migração assim como seleção e deriva genética. Os marcadores moleculares são capazes de acompanhar a segregação do locus avaliado desde que ocorra a existência de no mínimo duas formas alélicas que confere o polimorfismo no locus marcador (REGITANO & VENERONI, 2009).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Verificar a possível existência de polimorfismos em uma região do gene da Leptina em bovinos da raça Braford.

2.2. Objetivos Específicos

- Extrair o DNA genômico de uma amostra de animais;
- Isolar e amplificar um fragmento correspondente ao gene da Leptina utilizando a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR);
- Verificar a existência de polimorfismos nos produtos obtidos na PCR, utilizando-se a técnica de RFLP.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Pecuária de corte e mercado

Na primeira década do século XXI, a pecuária de corte brasileira atingiu vendas superiores a 2 milhões de toneladas de carnes para 150 países, dando ao Brasil o título de maior exportador de carne bovina do mundo, porém nossa produtividade esta abaixo de países como os EUA, Austrália e Argentina. Em estudos realizados pela FAO, para suprir à necessidade de carne bovina da população mundial a produção atual deverá ser dobrada em quatro décadas, e o Brasil certamente contribuirá para atingir esta meta (FOLHA, 2010). A atividade de pecuária de corte brasileira vem sofrendo uma inclusão da tecnologia que está influenciando de forma positiva na produtividade que torna perceptível seu aumento em relação ao crescimento do rebanho. O panorama geral da última década resume-se em valorização das terras e um acréscimo nos custos de produção, que não foram acompanhados pelos preços no mercado do boi gordo (JCMASCHIETTO, 2012).

Hoje a situação está mais favorável para a pecuária de corte. O ano de 2014 iniciou em um cenário otimista onde as demandas internas e externas apontavam a continuidade de alta nos preços e mantendo a atividade atrativa. Assim como as exportações também são positivas de acordo com a ABEIC (Associação Brasileira da Indústria Exportadora de Carne), onde a expectativa aponta aumento de 20% em relação ao ano de 2013, além da abertura de novos mercados como Arábia Saudita, Irã e China. Mas o risco não é descartado quando se fala em investimentos, pois a pecuária é uma atividade de ciclo longo e o Brasil passa por um período de recessão, juros altos e inflação elevada (CEPEA, 2014).

As perspectivas para 2014 vão se confirmando no final da safra 2013/2014, o mercado do boi gordo está estável principalmente na região Sul do país devido à restrição na oferta, com isso a indústria frigorífica encontra dificuldades para baixar os preços, pois as pastagens de inverno propiciam os pecuaristas manter seus animais no pasto e elevar a valorização da arroba. Esta é uma realidade diferente do resto do país, nas demais regiões com a chegada da estação seca as pastagens estão perdendo a capacidade de suporte o que faz com que os pecuaristas tenham que entregar seus animais ao frigorífico. (PECUÁRIA, 2014)

Mas não é somente o boi gordo que está com alta nos preços, pois este cenário reflete na venda de matrizes, touros e bezerros onde a falta de animais no mercado fez subir os preços, o que garante o investimento e aponta um bom momento neste setor, devido à necessidade de formação e recuperação de rebanho. Porém, a valorização dos bezerros afeta a etapa seguinte da atividade de cria, por encarecer o custo de produção e diminuir o poder de compra dos pecuaristas. Na mesma linha segue a alta do boi magro que influencia na decisão do pecuarista em confinar ou não. (PECUÁRIA, 2014)

O Plano Agrícola e Pecuário 2014/2015 foi divulgado pelo Governo Federal, seu início está marcado para 1º de julho deste ano e vai até 30 de junho de 2015, onde o investimento do governo ficou aproximadamente 15% acima do plano finalizado em junho deste ano. Para o setor da pecuária de corte objetiva-se o aumento da oferta de carne, o destaque está no financiamento para aquisições de matrizes e reprodutores, retenção de matrizes e aquisições de animais para engorda em regime de confinamento (BRASIL, 2014).

3.2. Raça Braford

A raça Braford surgiu na Flórida (EUA), na década de 60. No Brasil foi introduzida no final desta mesma década através do criador Rubem Silveira Vasconcellos, do município de Rosário do Sul (RS) que importou animais de origem americana da Raça Brahman com intuito de cruzá-los com bovinos da raça Hereford e criar uma nova raça com traços do genótipo dos zebuínos como a rusticidade e adaptabilidade, onde suas vantagens logo foram percebidas por outros pecuaristas e difundidas por meio de programas governamentais do estado do Rio Grande do Sul (ABHB, 2006).

Ao longo da década de 80 a atual Associação Brasileira de Hereford e Braford (ABHB) juntamente com a Embrapa Pecuária Sul, passaram a orientar por meio de suporte técnico os criadores e idealizadores, padronizando os cruzamentos e seleções a fim de consolidar a raça Braford, que em 1993 foi reconhecida pelo Ministério da Agricultura do Brasil como uma raça em formação, onde a ABHB passou a registrar genealógicos em todo território nacional e somente em 2003 obteve seu reconhecimento como uma raça no Brasil (ABHB, 2006).

Hoje a raça Braford é reconhecida por características zootécnicas como fertilidade, precocidade, habilidade materna, temperamento dócil, volume e qualidade de carne, resistência a ectoparasitas, rusticidade, rendimento de carcaça e boa adaptação aos trópicos, além da heterose. Estas características permitem criadores obterem ótimos desempenhos a campo com machos excelentes em reprodução, fêmeas com precocidade sexual e boa habilidade materna. Os novinhos são precoces na terminação podendo ser abatidos entre 18 a 24 meses de idade com peso de 380 a 450 kg e um rendimento de carcaça de 52 a 58% em animais criados a pasto (ABHB, 2006).

3.3. Gene Leptina

O gene da leptina foi descoberto por meio de pesquisas desenvolvidas para compreender a patologia da obesidade mórbida em seres humanos. Com técnicas de biotecnologia o gene da obesidade foi mapeado e clonado em camundongos e humanos, permitindo caracterizá-lo e evidenciar sua expressão em tecidos adiposos que sintetizam a proteína secretada na corrente sanguínea (ZHANG et al. 1994).

Em bovinos o gene da leptina possui grande semelhança quando comparados a humanos e camundongos, que compreende a 3 éxons separados por 2 íntrons correspondente à aproximadamente 18,9 Kb do genoma localizado no cromossomo 4 (TANIGUCHI et al. 2002; JI et al. 1998). Segundo Ceddia et al. (1998), receptores de leptina estão localizados no cromossomo 3 e possuem diversas formas que são expressas nos adipócitos e em diferentes tecidos periféricos e neurais que atuam no controle da ingestão de alimentos, uso da energia e indicador da condição nutricional do organismo para estimular ações de outros sistemas fisiológicos.

A expressão da leptina ocorre principalmente nos adipócitos, mas esta também correlacionada à insulina, que formam alças reflexas onde a insulina promove a secreção de leptina e a leptina sérica reduz a produção da insulina. Além disso, admite-se que a leptina atua sobre a ingestão e o balanço energético através do sistema nervoso central com a anulação da secreção de neuropeptídeo-Y (NYP) que induz a ingestão e reduz a termogênese, por tanto a secreção da leptina sofre influência de fatores fisiológicos, nutricionais e endócrinos (XIE et al. 1999).

Sansinanea et al. (2001), propõe que a leptina atua como indicador ao sistema nervoso central (SNC) da quantidade de energia armazenada nos adipócitos, esta informação faz com que as redes neurais controlem e garantam um balanço energético corporal. Neste mesmo estudo os autores mencionam que a leptina tem influencia na regulação de carboidratos no metabolismo dos lipídios, estimula a produção hepática de glicose, regulação da glicemia que por consequência controla a síntese hepática de triglicerídeos e aumento da oxidação de ácidos graxos.

Quando a leptina é correlacionada à reprodução, a hipótese mais aceita é a de Willians et al. (2002) que referencia o efeito do NYP como mediador primário da ação da leptina no hipotálamo sobre o controle da liberação do LH (hormônio luteinizante), onde este hormônio por meio de sinais neuroendócrinos transmite informações do estado nutricional aos mecanismos que regulam a função reprodutiva dos ruminantes (NAGATANI et al. 2000). Assim como Thomas et al. (2002), sugerem uma possível interação entre crescimento-reprodução em touros, onde atribuíram que a leptina influencia no peso dos touros, circunferência escrotal e concentração de testosterona na corrente sanguínea.

Mecanismos da reprodução em bovinos foram descritos por Duarte Júnior et al. (2014), que mencionaram altas concentrações de leptina séricas atingem tecidos

alvos como células gonadotróficas da hipófise, células teca, granulosas e células intersticiais do ovário e do endométrio, permitindo a comunicação com receptores celulares específicos que pertencem a classe I sendo os mesmos do hormônio de crescimento (GH), prolactina entre outros. Salman et al. (2007), atribuíram a ação e controle da reprodução em bovinos com a presença destes mesmos receptores no eixo hipotálamo-hipófise-gonadal.

3.4. Marcadores Moleculares

O conhecimento do genoma bovino permite a identificação de características quantitativas através de marcadores moleculares, estes por sua vez detectam diferenças na sequência do DNA, viabilizando a seleção indireta para os genes de interesse. A detecção de marcadores e características de interesse econômico (*Economic Trait Loci* - ETL) pode ser realizada através do método de varredura, que consiste na genotipagem do genoma, por meio de marcadores que estabelece associações entre alelos específicos dos marcadores e a variação da característica fenotípica. Outro método utilizado é pelo gene candidato, baseado em estudo de variação fenotípica para uma característica em relação ao nível de polimorfismo do DNA (MARTINEZ et al. 2000).

Marcadores moleculares são cada vez mais utilizados em diversas raças de bovino para análises de polimorfismos, que permitem monitorar regiões do genoma, transcritas ou não. Estas informações são obtidas através da técnica de reação em cadeia pela polimerase (*Polymersase Chain Reaction* - PCR). Dentre os marcadores existentes os mais utilizados são os de polimorfismos de tamanho do fragmento de restrição (*restriction fragment length polymorphism* - RFLP), os marcadores do tipo microssatélite (*simple sequence repeats* - SSR) e os polimorfismos de nucleotídeo único (*single nucleotide polymorphism* - SNP) (SIQUEIRA et al. 2007). Para a escolha do tipo de marcador a ser utilizado consideram-se informações relevantes que vão além da aplicabilidade destes marcadores como a dificuldade da técnica, número de genótipos necessários e seus custos de obtenção, informatividade, distribuição pelo genoma e tipo de interação alélica (REGITANO & VENERONI, 2009).

Na bovinocultura de corte há índices zootécnicos importantes, tais como altos índices de reprodução, desenvolvimento ponderal, conversão alimentar, deposição

de gordura subcutânea e intramuscular (marmoreio), para que se tenha eficiência econômica no setor ligado diretamente a produtividade, qualidade da carne e preço do produto final. A vantagem da seleção assistida por marcadores (*Marker Assisted Selection* - MAS) está em aumentar o ganho genético das características de difícil mensuração, baixa herdabilidade e limitadas pelo sexo, além das características que necessitam de suas progênes para serem avaliadas. (MARTINEZ et al. 2002).

A MAS utiliza informações de regiões específicas dos cromossomos, na qual os genes que influenciam as características quantitativas (*quantitative trait loci* - QTL) estão localizados, que pode levar a identificação dos indivíduos que possuem combinações favoráveis de QTLs, permitindo uma maior acurácia da seleção. A utilização de marcadores ligados a ETL permite a seleção de animais logo após o nascimento com base no genótipo que eles carregam para estes marcadores, porém esta tecnologia não descarta as avaliações de diferença esperada na progênie (DEP), esta deve ser realizada simultaneamente para evitar que animais de alto mérito genético possam ser eliminados em uma possível associação não coexistente de um marcador com um QTL e permitir uma rápida fixação do alelo selecionado e à perda de variabilidade durante o processo de seleção (REGITANO & VENERONI, 2009).

3.5. Polimorfismo no gene da leptina

Mutações na expressão do gene da leptina ou de seus receptores foram observados em humanos e camundongos por Houseknecht e Portocarrero (1998), relacionadas a sintomas de obesidade, infertilidade e resistência a insulina. Diversos estudos afirmam a associação de polimorfismo com a deposição de gordura na carcaça em raças de bovino de corte (POMP et al. 1997; WILKINS & DAVEY, 1997; KONFORTOV et al. 1999). Assim como Liefers et al. (2002) encontram a presença de polimorfismo do gene da leptina em bovino de leite para características de balanço energético, produção de leite, peso vivo e fertilidade.

A transição observada no éxon dois por Buchanan et al. (2002) de uma citosina por timina que codifica a alteração de aminoácido arginina para uma cisteína, afirma que a frequência do alelo T foi relacionada ao grupo de animais com carcaças mais gordas e o alelo C aos de carcaças mais magras, conferindo a estes menor expressão do gene da leptina.

Suguisawa (2005), avaliou bovinos de corte de diversos grupos genéticos para analisar o polimorfismo do gene da leptina, em todos os grupos presentes neste estudo foi observada associação do polimorfismo da leptina com gordura da garupa avaliada por ultra-som, rendimento de carcaça, força de cisalhamento e peso do corte Contra-filé.

Somavilla et al. (2012), avaliaram em uma população da raça Nelore evidências de seleção para as características de crescimento e deposição de gordura, o gene da leptina foi associado a deposição de gordura apresentando padrões de homozigose e frequências compatíveis que evidenciam os efeitos dos programas de melhoramento genético. O polimorfismo no gene da leptina foi identificado e associado com características de rendimento de carcaça quente, área do olho do lombo e espessura de gordura da carcaça em uma população da raça Nelore (FERRAZ et al. 2009).

O polimorfismo do gene da leptina em bovinos de raças sintéticas foi associado a características de produção, onde os animais portadores do alelo TT apresentaram maior espessura de gordura na garupa e maior ganho de peso até o sobreano (CERÓN-MUÑOZ, et al. 2009). Este mesmo achado foi observado por Londoño & Andrea (2012) em bovinos da raça Sanmartinero.

Em estudo realizado por Camacho & Gutiérrez (2012), foi constatado polimorfismo do gene da leptina no exón 3 associado a características de ganho de peso em uma população de bovinos da raça Blanco Orijenegro (BON), onde os alelos TC e CC possuem efeito negativo para a característica avaliada. Salman & Giachetto (2008), observaram polimorfismo do tipo RFLP na região do intron 2 do gene da leptina em diferentes grupos de cruzamentos bovinos e sugerem a avaliação deste polimorfismo para características produtivas e reprodutivas nos bovinos de corte.

Armstrong et al. (2011), avaliou uma população de bovinos crioulos uruguaios onde o polimorfismo do gene da leptina foi observado que animais com menor ganho de peso e deposição de gordura eram portadores do alelo C. Em estudo realizado na Colombia com bovinos da raça Senepol ao avaliarem o polimorfismo do gene da leptina, constataram que maior frequência do alelo T favorece o ganho de peso (SEPÚLVEDA et al. 2012).

O polimorfismo do gene da leptina foi avaliado e atribuiu-se que animais portadores de maior frequência do alelo T presentes nas raças Aberdeen Angus e

Hereford foi associada a maior predisposição ao marmoreio (PIÑEIRA et al. 2012). Miceikienė et al. (2013), avaliaram o gene da leptina em diferentes raças de bovinos, neste estudo observou-se associação significativa para ganho de peso diário nos três primeiros meses de engorda.

Estudos demonstram fortes indícios que a leptina regula a liberação de GnRH por meio da condição nutricional das fêmeas avaliadas, quando em condições nutricionais deficientes os níveis de leptina e gonadotrofinas são relativamente baixos, permitindo evidenciar que a leptina é o indicador metabólico para inibir a atividade reprodutiva (CUNNINGHAM et al.1999).

Em estudo desenvolvido por Schoenau (2003), avaliou-se a associação de polimorfismo do gene da leptina com a precocidade sexual em novilhas da raça Nelore, indicando que animais portadores do alelo B possuem uma probabilidade muito maior de serem precoces que os animais não portadores deste alelo.

Strauch et al. (2003), afirma que vacas adultas em pós-parto apresentam redução no intervalo entre parto/concepção quando apresentam altas concentrações séricas de leptina. Passos (2006) diverge desta afirmação, pois em seu estudo fêmeas com maior nível de expressão da leptina, apresentam maior intervalo entre partos, para ele admite-se que a leptina reduz a ovulação, inibe a síntese de esteroides e estimula a lactação, no pós-parto desacelera a recuperação das funções reprodutivas em bovinos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Coleta de amostras e extrações de DNA genômico

A fazenda Meia Lua esta locada em duas unidades. A unidade de Itapema e unidade Estoril, localizadas no município de Itapema, pertencente ao Estado de Santa Catarina, situado a 60 km de distância da capital Florianópolis (GUIASC, 2013). (Figura 1).

É um empreendimento familiar de pecuária de corte ciclo completo, pioneira da raça Braford no Estado de Santa Catarina. A atividade pecuária remete-se ao final da década de 70 pelo fundador Dr. Jacob Momm Filho, a gestão é realizada por seu filho Eng. Agr. Rafael Becker Momm (MEIALUA, 2014). Atualmente a fazenda possui certificação no Projeto Qualidade Total em Bovinos de Corte, do Ministério da

Agricultura e ABHB, resultado de um planejamento e trabalho desenvolvido que estabeleceu um equilíbrio nas fases do ciclo reprodutivo e processo de criação com ciclo de dois anos, onde no pico de produção atinge um plantel de aproximadamente 1.600 animais (MEIALUA, 2014).



Figura 1. Fazenda Meia Lua

Foram coletadas amostras de folículos pilosos da vassoura da cauda de 29 animais: 14 matrizes e suas respectivas progênes mais a amostra de um touro. As amostras foram obtidas com o auxílio de um alicate para puxar os pelos conforme Figura 2, sendo posteriormente acondicionadas em embalagens plásticas individuais devidamente identificadas.

Posteriormente no Laboratório de Ensino e Pesquisa em Genética Animal da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), cerca de 30 pelos com folículos/animal foram transferidos para tubos de microcentrifuga (1,5 ml) e identificados com a numeração do animal. (Figura 3). A extração do DNA genômico dos folículos pilosos foi realizada utilizando o método Fenol-Clorofórmio-Álcool Isoamílico, adaptado de Lima (2003).



Figura 2. Coleta dos folículos pilosos



Figura 3. Processamento das amostras

Foram adicionados 500 μL de solução TE-TWEEN em cada tubo, seguido de incubação no banho a 65°C por 1,5 horas, posteriormente adicionou-se 20 μL de proteinase K (100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) e incubou-se a 55°C por 6 horas, ao final, incubou-se a 37°C por uma noite. (Figura 4).

Após esta etapa, adicionou-se 1 volume de PCI (fenol-clorifórmio-álcool-isoamílico – 25:24:1) para um volume de amostra e agitou-se os tubos vigorosamente por 10 segundos em agitador automático. Posteriormente, foi realizada centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos a 23°C, sendo o sobrenadante transferido para um novo tubo devidamente identificado, resultando em um volume final de aproximadamente 300 μL .

Em seguida, foi executada a precipitação do DNA com 1/10 do volume da amostra de acetato de sódio 0,3 M (cerca de 30 μL) e etanol absoluto gelado (aproximadamente 1000 μL). Prosseguiu-se com uma nova centrifugação a 14.500 rpm por 60 minutos a 4°C. Finalizou-se com o descarte do sobrenadante, sendo o DNA remanescente seco a temperatura ambiente e em seguida re-suspendido em 100 μL de água ultra pura.

Após as extrações, as amostras de DNA foram quantificadas em espectrofotômetro (Nanodrop 1000, Thermo Scientific®) utilizando-se como

parâmetro as amostras que apresentaram concentração igual ou superior a 100 ng/ μ L e relação A260/280 entre 1,8 a 2,0. (Figura 5).



Figura 4. Incubadora a banho



Fonte: Arquivo Labwrench

Figura 5. Nanodrop 1000

4.2. Obtenção dos iniciadores e realização da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)

As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores específicos para isolar a região estrutural do gene da Leptina, foram desenhadas com base nas informações disponíveis no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>). O par de iniciadores gerado apresentou as seguintes, respectivamente: Forward – 5' CCGAACACCAGAAAGTGCA 3'; Reverse - 5' GGGACGGGGACTTACCATTG 3'.

As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 25 μ L/amostra, contendo 100 ng de DNA genômico, 0,5 μ M de cada “primer”, tampão PCR 1X, 100 μ M de dNTPS, 0,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen®). Os ciclos de amplificação foram realizados em termociclador Biometra®, com a seguinte programação: 95°C por 5 minutos (desnaturação do DNA inicial); 95°C por 30 segundos (desnaturação do DNA no ciclo); 52°C por 30 segundos (anelamento dos iniciadores); 72°C por 30 segundos (extensão do DNA no ciclo); as etapas de

desnaturação, anelamento e extensão foram repetidas em 35 ciclos. Após estes ciclos, as amostras foram mantidas a 72°C por 5 minutos até inatividade enzimática seguidas de manutenção a 4°C. (Figura 6).

Para verificar o resultado da reação de amplificação uma alíquota de 5 µL de cada amostra foi diluída em 3µL de azul de Bromofenol, xileno-cyanol e glicerol e submetida à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, utilizando tampão TBE 1X e brometo de etídio (0,05 µG/ml) a 80V por aproximadamente 50 minutos. Após esta etapa, o gel foi exposto a luz U.V e fotodocumentado para confirmação da eficiência da PCR. (Figura 7).



Figura 6. Termociclador

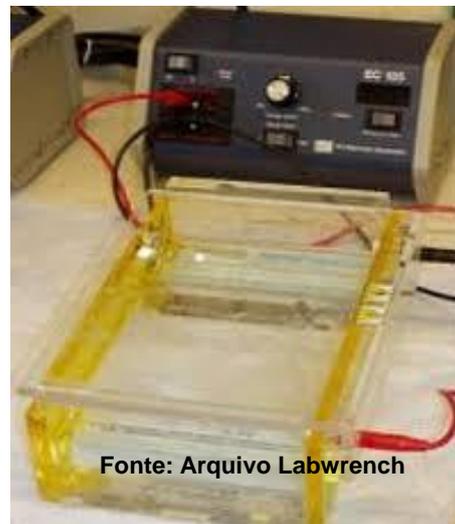


Figura 7. Cuba de eletroforese

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os procedimentos de extração do DNA genômico das amostras de folículos pilosos utilizados neste trabalho mostraram-se eficientes, conforme pode ser observado na Figura 8. Para a obtenção desta imagem, uma alíquota de 5 µL de cada amostra de DNA extraído foi diluída em 3µL de azul de Bromofenol, xileno-cyanol e glicerol e submetida à eletroforese em gel de agarose a 0,5%, utilizando tampão TBE 1X e brometo de etídio (0,05 µG/ml) a 80V por aproximadamente 50

minutos. Após a eletroforese, o gel foi submetido à luz ultravioleta e fotodocumentado.

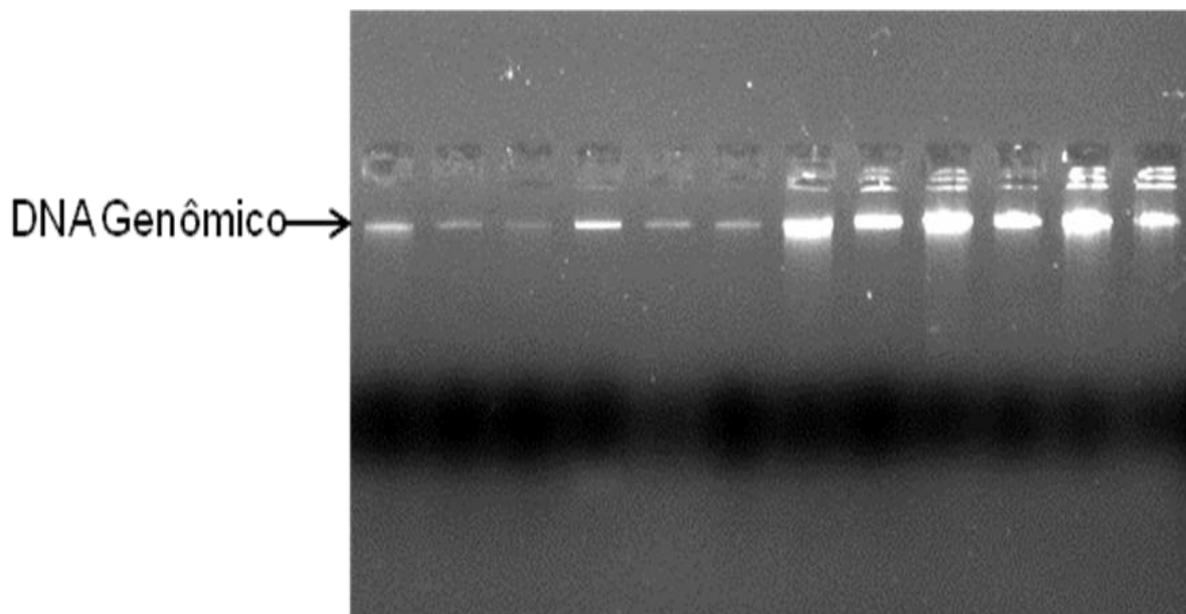


Figura 8. Imagem representativa dos resultados obtidos no procedimento de extração do DNA genômico das amostras. Gel de agarose a 0,5%.

Os resultados obtidos na extração corroboram Laureano et al. (2006) que também utilizaram a técnica adaptada de Lima (2003) em pelos de novilhas da raça Nelore. As quantificações das amostras de DNA no equipamento Nanodrop mostraram que todas as amostras possuíam, no mínimo, 100 ng/ μ L para utilização na etapa de PCR.

As reações de PCR realizadas com o par de iniciadores neste estudo não foram eficientes para isolar e amplificar adequadamente a região estudada do gene da leptina à partir do DNA genômico obtido nas amostras. (Figura 9).

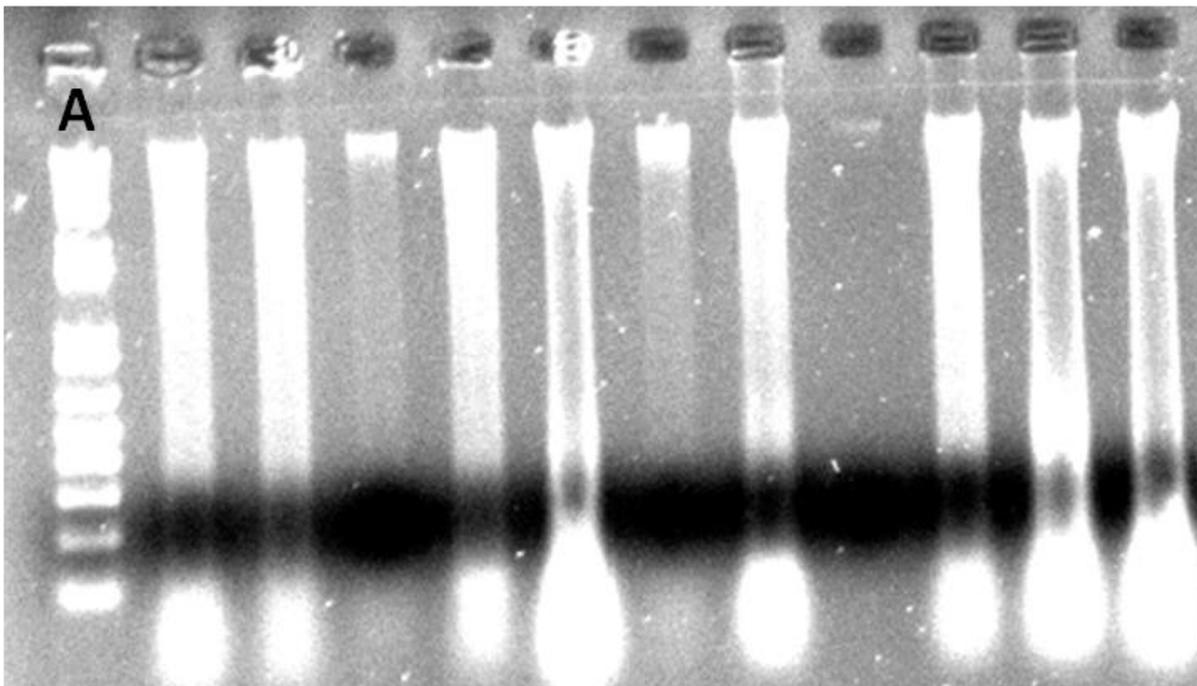


Figura 9. Imagem representativa dos resultados obtidos após a PCR. Gel de agarose a 1,5%. A=Marcador de peso molecular 1kb plus DNA ladder (Invitrogen)

É possível observar que a maioria das amostras apresentou, após a eletroforese e visualização em luz UV, um “arraste” que pode ser atribuído a vários fatores: excesso de ciclos de amplificação, tempo das etapas de extensão e/ou anelamento dos iniciadores muito extenso, degradação ou contaminação do DNA ou até mesmo erros na fabricação dos iniciadores. Estes resultados obtidos na etapa da PCR inviabilizaram a execução das análises de RFLP propostas neste trabalho.

6. CONCLUSÃO

Os procedimentos de extração do DNA genômico das amostras de pelos da vassoura da cauda dos animais amostrados neste estudo foram realizados com êxito.

As reações de PCR para o gene da leptina mostraram-se inconclusivas, entretanto, novas abordagens visando-se a otimização destas reações para possibilitar a aplicação da técnica de RFLP devem ser realizadas para verificar a possível existência de polimorfismos.

7. ATIVIDADES COMPLEMENTARES

Ao longo do estágio foi realizado um acompanhamento dos manejos da Fazenda Meia Lua que trabalha com bovinocultura de corte ciclo completo.

7.1. Diagnóstico de gestação

O período de acasalamento ocorre entre os meses de Novembro ao final de Janeiro onde as fêmeas aptas à reprodução são submetidas à Monta Natural (MN) e/ou Inseminação Artificial (IA).

Após 70 dias da finalização do acasalamento foi realizado pelo Veterinário Cristiano Ramos o exame de toque retal em 396 vacas para confirmar gestação. Os índices alcançados foram de 88% de vacas prenhes e as vacas falhadas foram destinadas a comercialização. (Figura 10).



Figura 10. Exame de toque retal

7.2. Desmane dos bezerros

O nascimento dos bezerros ocorre entre os meses de Agosto a Outubro, e estes ficam junto da vaca até seus 8 meses de idade. O período da desmama geralmente é realizado no mês de Maio, o manejo se dá pela separação das mães e pesagem dos bezerros. (Figura 11).

Os machos selecionados conforme avaliações de desempenho permanecem juntos e o desenvolvimento a campo destes animais é acompanhado para que sejam possíveis touros.

Já os bezerros mais pesados, mas que não foram selecionados são destinados ao confinamento e os demais assim como as fêmeas passarão para a fase da recria com alimentação a base de pasto cultivado.



Figura 11. Manejo de desmame

7.3. Pesagem de animais confinados

A propriedade possui um galpão com capacidade de 100 animais com 3m²/animal como mostra a figura 12, onde ficam confinados após desmame com 8 meses de idade pesando em média 202 kg de peso vivo. Com 30 dias de confinamento é realizada a primeira pesagem destes animais que ganham em média valores abaixo de 1 kg de peso vivo/dia por estarem se adaptando a nova alimentação. A expectativa é de um ganho em até 2 kg de peso vivo/dia.

A ração é composta aproximadamente 17% de proteína mais carboidratos e minerais. Além do concentrado é fornecido também volumoso, os animais recebem diariamente de 1,5 a 2% de seu peso vivo em quantidade de ração diária. Por meio de pesagens os animais são alocados em boxe com padrões de peso. A quantidade de alimento fornecido varia conforme a conversão alimentar (CA) para que seja rentável o confinamento.

Estes animais serão vendidos para frigorífico como superprecoces pesando em média 430 kg de peso vivo com 14 meses de idade.



Fonte: Arquivo Meia Lua

Figura 12. Animais em confinamento

7.4. Seleção de reprodutores

A seleção de touros e matrizes assim como o melhoramento do rebanho é realizada através de medidas, pesagens, avaliações visuais de padrão da raça e parentesco de animais com excelentes índices de desempenho, com isso é possível identificar quais as vantagens de cada animal selecionado como touro e matriz e por consequência, atingir maior produtividade no rebanho. (Figura 13).

Uma parte destes animais selecionados permanece na fazenda para reposição de plantel e os demais são comercializados em leilões. (Figura 14).

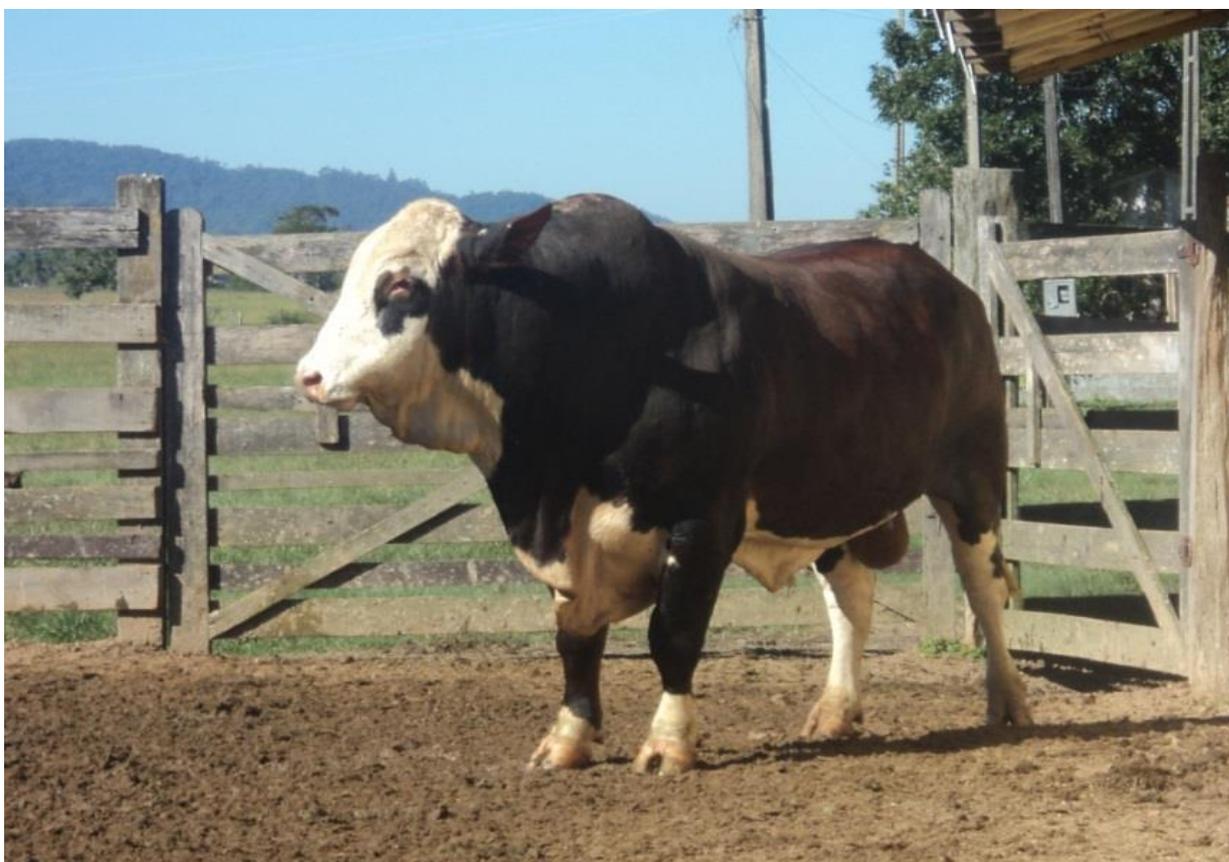


Figura 13. Touro selecionado



Figura 14. Animais comercializados em leilão

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O acompanhamento das atividades pecuárias da Fazenda Meia Lua permitiu observar na prática, técnicas estudadas ao longo da graduação.

A observação da dinâmica envolvida entre gestor e colaboradores praticada na propriedade, proporcionou uma importante vivência da atuação como profissional da área de Agronomia. Portanto, esta etapa foi enriquecedora tanto no âmbito técnico quanto no desenvolvimento organizacional.

A utilização da MAS pode auxiliar no programa de seleção genética da Fazenda Meia Lua com a antecipação da avaliação dos animais para características específicas e seleção de características de baixa herdabilidade ou não observadas através de avaliação fenotípica. Além disso, é possível obter incremento na acurácia da seleção e a fixação do alelo selecionado em menor tempo.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABHB – **Associação Brasileira de Criadores de Bovinos das Raças Hereford e Braford**. Disponível em: <http://www.hereford.com.br/> . Acesso em: 20/05/2014.
2. ALENCAR, M. M. Perspectivas para o melhoramento genético de bovinos de corte no Brasil. In: 41ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, Campo Grande. **Palestras dos simpósios**, Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2004.p.1-14.
3. ARMSTRONG, E, et al. Marcadores moleculares asociados al veteado de la carne en bovinos criollos uruguayos. **Archivos de zootecnia**, v. 60, n. 231, p. 707-716, 2011.
4. BRASIL – **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/>. Acesso em: 27/05/2014.
5. BUCHANAN, F.C, et al. Association of a missense mutation in the bovine leptin gene with carcass fat content and leptin mRNA levels. **Genetic Selection Evolution**, v.34, p.105-116, 2002.
6. CAMACHO, R. E; & GUTIÉRREZ, A. Asociación de polimorfismos de nucleótido simple y de haplotipos para el gen de la Leptina con la ganancia de peso en la raza bovina blanco orejinegro usando técnicas bayesianas. **Revista Comunicaciones en Estadística**, v. 5, n. 1, p. 33-53, 2012.
7. CEDDIA, R.P. et al. Pivotal role of leptin in insulin effects. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.31, p.715-22, 1998.
8. CEPEA – **Agromensal - CEPEA/ESALQ Informações de Mercado**. Disponível em: <http://www.cepea.esalq.usp.br/>. Acesso em: 27/05/2014.
9. CERÓN-MUÑOZ, M. F, et al. Marcadores del gen leptina en bovinos cruzados con Angus, Cebú, Romosinuano y Blanco Orejinegro. **Revista Científica**, v. 19, n. 4, p. 371-381, 2009.
10. CUNNINGHAM, M.J; CLIFTON, D.K; STEINER, R.A. Leptin's actions on the reproductive axis: perspectives and mechanisms. **Biology of Reproductive**, v. 60,p. 216-222, 1999.
11. DUARTE JÚNIOR, M. F. et al. Aspectos relacionados à fisiologia do anestro pós-parto em bovinos. **In Colloquium Agrariae**. V.9, n. 2, 2014.
12. EUCLIDES FILHO, K. O melhoramento Genético Animal no Brasil: fundamentos, história e importância. Campo Grande, **Embrapa Gado de Corte**, 1999. P.63.
13. EUCLIDES FILHO, K. Evolução do melhoramento genético de bovinos de corte no Brasil. **Rev. Ceres, Viçosa**, v. 56, n.5, 2009.p. 620-626.
14. FERRAZ, J. B. S, et al. Association of single nucleotide polymorphisms with carcass traits in Nellore cattle. **Genetics and Molecular Research**, v. 8, n. 4, p. 1360-1366, 2009.
15. FOLHA – **Folha de São Paulo. Mercado**. Disponível em: <http://www1.folha.uol.com.br/>. Acesso em: 27/05/2014.
16. GARCIA, J. F. Utilização de marcadores moleculares para a seleção. In: 2º SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL, Londrina-PR, **Anais**, 2006.p. 195-201.
17. GUIASC – Guia Santa Catarina. Disponível em: <http://www.guiasantacatarina.com.br/>. Acesso em: 10/06/2014.

18. HOUSEKNECHT, K.L.; PORTOCARRERO, C.P. Leptin and its receptors: regulators of wholebody energy homeostasis. **Domestic Animal endocrinology**, v.15, p.457-75, 1998.
19. JCMASCHETTO – **Sementes para pastagens**. Disponível em: <http://www.jcmaschietto.com.br/>. Acesso em: 27/05/2014.
20. JI, S. et al. Partial cloning and expression of bovine leptin gene. **Animal Biotechnology**, v.9, p.1-14, 1998.
21. KONFORTOV, B.A; LICENCE, V.E; MILLER, J.R. Re-sequencing of DNA from a diverse panel of cattle reveals a high level of polymorphism in both intron and exon. **Mammalian Genome**, v.10, p.1142-5, 1999.
22. LABWRENCH – Lab Equipment Information and Discussions. Disponível em: <http://www.labwrench.com/>. Acesso em 26/06/2014.
23. LAUREANO, M. M. M., OTAVIANO, A. R., COSTA, R. B., LIMA, A. L. F., SALMAN, A. K. D., TONHATI, H., SENA, J. A. D., SEZANA, J. C., ALBUQUERQUE, L. G. In: World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, 8., 2006, Belo Horizonte. Characterization of polymorphisms within insulin-like growth factor-i and prolactin genes of three groups of nellore heifers. World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, 2006. cd.
24. LIEFERS, S.C. et al. Associations between leptin gene polymorphisms and production, live weight, energy balance, feed intake, and fertility in Holstein heifers. **Journal of Dairy Science** **85**. p.1633-1638, 2002.
25. LIMA, Silmara Paula Gouveia. Estudos do polimorfismo da região promotora do gene do hormônio do crescimento bovino, em rebanhos Nelore selecionados para peso pós-desmama. Dissertação (mestrado). Universidade Estadual Paulista, FCAV, 2003.
26. LONDOÑO, C; & ANDREA, J. **Polimorfismo de los genes calpaína, calpastatina y leptina en diez razas bovinas criollas mediante siete marcadores de Polimorfismos de nucleótido simple (snps)**. 2012. Tese de Doutorado. Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira, 2012.
27. MARTINEZ, M.L; MACHADO, M.A. Programa genoma brasileiro de bovinos e suas perspectivas de aplicações práticas. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE MELHORAMENTO ANIMAL, Campo Grande. **Anais ...**, p.48-57, 2002.
28. MARTINEZ, M.L; MACHADO, M.A; FERREIRA, A.M. Biotecnologia na pecuária: genética molecular. **Informe Agropecuário**, v.21, n.204, p.67-78, 2000.
29. MEIALUA – Braford da Meia Lua. Disponível em: <http://www.braforddameialua.com.br/>. Acesso em: 10/06/2014.
30. MICEIKIENĖ, I, et al. Influencia de la hormona de crecimiento y genes de leptina en rasgos de ceba de ganado vacuno. **Revista Cubana de Ciencia Agrícola**, v. 47, n. 3, 2013.
31. NAGATANI, S. et al. Leptin Regulates Pulsatile Luteinizing Hormone and Growth Hormone Secretion in the Sheep. **Endocrinology**, v.141, p.3965-397520, 2000.
32. PASSOS, D.T. **Efeito de polimorfismos no gene LEP na expressão da leptina em adipócitos de bovinos de corte**. 2006. 81 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2006.
33. PECUÁRIA – **Pecuária, o que é do Boi esta aqui**. Disponível em: <http://www.pecuaria.com.br/>. Acesso em: 27/05/2014.

34. PIÑEIRA, J, et al. Distribución de polimorfismos asociados al grado de infiltración de grasa intramuscular en siete razas bovinas de carne utilizadas en la Región de La Araucanía, Chile. **Archivos de medicina veterinaria**, v. 44, n. 1, p. 43-52, 2012.
35. POMP, D. et al. Mapping of leptin to bovine chromosome 4 by linkage analysis of PCR-based polymorphism. **Journal of Animal Science**, v.75, p.1427, 1997.
36. REGITANO, L. D. A. & VENERONI, G. Marcadores moleculares e suas aplicações no melhoramento animal. In: **Embrapa Pecuária Sudeste-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: SIMPÓSIO DE BIOLOGIA MOLECULAR APLICADA À PRODUÇÃO ANIMAL, 2., São Carlos, SP. **Anais...** São Carlos, SP: Embrapa Pecuária Sudeste, 2009.
37. SALMAN, A.K.D; RAPHAE, B.C; GIACHETTO, P.F. Gene da leptina em ruminantes. **Revista Eletrônica de Veterinária**, v.3, n.12, 2007.
38. SALMAN, A. K. D. S; & GIACHETTO, P. F. Identificação de polimorfismos no gene da leptina bovina. **Embrapa Rondônia**, 2008.
39. SANSINANE, A. S. et al. Serum leptin levels in cattle with different nutritional conditions. **Nutrition Research**, v. 21, p. 1045 -1052, 2001.
40. SCHOENAU, W. **Polimorfismos nos genes do receptor do IGF-I e da Leptina na espécie bovina e sua associação com produção e reprodução**. 2003. 150 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade Federal de Santa Maria. Santa Maria, 2003.
41. SEPÚLVEDA, J. C, et al. Genetic variability of Senepol cattle in Colombia using molecular markers. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v. 25, n. 2, p. 183-190, 2012.
42. SIQUEIRA, F. et al. Genética molecular aplicada à qualidade da carne bovina. **Embrapa Gado de Corte. Documentos**, v. 170, 2007.
43. SOMAVILLA, A, et al. Aplicação da metodologia de homozigose do haplótipo estendido (EHH) para genes relacionados com crescimento e deposição de gordura em bovinos da raça Nelore. In: **Embrapa Informática Agropecuária-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO ANIMAL, 9, 2012.
44. STRAUCH, T.A, et al. Effects of lasalocid on circulating concentrations of leptin and insulin-like growth factor-I and reproductive performance of postpartum Brahman cows. **Journal of Animal Science**, v.81, p.1363-1370, 2003.
45. SUGISAWA, L. **Identificação de genótipos superiores para crescimento e qualidade de carcaça em bovinos de corte submetidos ao modelo biológico superprecoce**. 2005. 120 f. Tese (Doutorado em Nutrição e Produção Animal) – Universidade Estadual de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia campus Botucatu. Botucatu, 2005.
46. TANIGUCHI, Y. et al. Genomic structure and promoter analysis of the bovine leptin gene. **IUBMB life**, v.53, p.131-135, 2002.
47. THOMAS, M. G. et al. Relationships of metabolic hormones and serum glucose to growth and reproductive development in performance tested Angus, Brangus, and Brahman bulls. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 80, p. 757–767, 2002.
48. WILKINS, R.J. & DAVEY, H.W. A polymorphic microsatellite in the bovine leptin gene. **Animal Genetics**, v.28, p.376, 1997.

49. WILLIAMS, G.L. et al. Leptin and its role in the central regulation of reproduction in cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, v.23, p.339-49, 2002.
50. XIE, C; WEGNER, J; BROCKMANN, G.A. Leptin, a palatability molecule? – A review. **Archiv Fuer Tierzucht**, p.191-9, 1999.
51. ZHANG, Y. et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**. v.372, p.425-32, 1994.