



Acta Scientiarum. Animal Sciences

ISSN: 1806-2636

eduem@uem.br

Universidade Estadual de Maringá

Brasil

Ribeiro, Juliana Maria; Gasparino, Eliane; Sommer Marques, Débora; Luizetti, Fabiane; Menck Soares, Maria Amélia; Zeoula, Lucia Maria

Método não-invasivo na obtenção de DNA de búfalos

Acta Scientiarum. Animal Sciences, vol. 30, núm. 4, 2008, pp. 479-483

Universidade Estadual de Maringá

.png, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=303126494011>

- ▶ Como citar este artigo
- ▶ Número completo
- ▶ Mais artigos
- ▶ Home da revista no Redalyc

## Método não-invasivo na obtenção de DNA de búfalos

**Juliana Maria Ribeiro<sup>1</sup>, Eliane Gasparino<sup>1\*</sup>, Débora Sommer Marques<sup>2</sup>, Fabiane Luizetti<sup>2</sup>, Maria Amélia Menck Soares<sup>3</sup> e Lucia Maria Zeoula<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Departamento de Zootecnia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil. <sup>2</sup>Programa de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil. <sup>3</sup>Colegiado de Ciências Biológicas, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, Paraná, Brasil. \*Autor para correspondência: E-mail: egasparino@uem.br

**RESUMO.** O objetivo do trabalho foi comparar dois diferentes protocolos de extração de DNA de pelos de búfalos (*Bubalus bubalis*) e comparar três regiões de coleta de material (nuca, paleta direita e testa). Foram utilizados quatro búfalos com três repetições por animal e por região. No protocolo 1, foi utilizada a técnica do fenol-clorofórmio e no protocolo 2, a técnica de extração com CTAB. O protocolo 2 apresentou maior média de concentração de DNA para as amostras de pelos. Em relação ao local de retirada dos pelos, não foram encontradas diferenças significativas, porém nota-se que a região da testa dos animais apresentou maior concentração de DNA quando extraído com CTAB. Com relação à praticidade de utilização dos dois métodos avaliados, o protocolo 2, além de ter apresentado maior concentração de DNA, apresentou menor tempo de execução, 3h 50 min., além de evitar a utilização de mais um reagente tóxico, como é o caso do fenol. Por esse motivo, sugere-se que a coleta seja efetuada na região da testa, levando-se em consideração a praticidade e a acessibilidade aos pelos e sugere-se também a aplicação do protocolo de extração de DNA com CTAB, pela praticidade e pelo menor tempo de execução.

**Palavras-chave:** CTAB, extração de DNA, fenol, pelos.

**ABSTRACT. Non-invasive method for buffalo DNA extraction.** The objective of this paper was to compare two different protocols for DNA extraction from buffalo (*Bubalus bubalis*) fur. Also, three sites for the fur source (back of the head, right shoulder and forehead) were compared. For the experiments, four animals were used and three replicates for each site on each animal were performed. For protocol 1, the phenol chloroform technique was used, and the CTAB extraction technique was used for protocol 2. Protocol 2 resulted in a higher average of DNA concentration for the fur samples. Considering the body region from where the fur was extracted, there were no significant differences in DNA concentration. However, the forehead showed a higher concentration when extracted with CTAB. Considering the ease of use for each protocol, protocol 2, in addition to presenting greater concentrations of DNA, took less time to be performed – three hours and fifty minutes, and did not require another toxic reagent, such as phenol. For this reason, it is recommended that the material be extracted from the forehead, as it is an easy site to access the fur. The recommended protocol for DNA extraction is with CTAB, because of its practicality and lower execution time.

**Key words:** CTAB, DNA extraction, phenol, fur.

### Introdução

A população de bubalinos, no Brasil em 2008, é estimada em mais de 2 milhões de animais, de acordo com a Associação Brasileira de Criadores de Búfalos (ABC, 2008). Uma das características mais marcantes dos búfalos é o seu elevado desempenho com relação à produção de carne. É notório que os búfalos têm exibido maior ganho de peso do que os zebuíños e competido com as melhores raças europeias de corte, apresentando valores muito semelhantes em desempenho. Quanto à produção

de leite, os búfalos exibem produtividade economicamente superior aos zebuíños (Nascimento, 1993). O leite de búfala possui composição de 4,36% de proteína, 4,8% de lactose e 17,96% de sólidos totais (Búfalos..., 1997); é mais concentrado que o de bovino e seu teor de gordura (7,64%) é duas vezes maior que o da vaca de origem europeia, que possui em média 3,90%, e da vaca zebu, 4,97%.

Os ganhos genéticos obtidos por meio de informações fenotípicas dos animais nos últimos

tempos têm ganhado uma ferramenta auxiliar poderosa que possibilita o estudo direto do material genético. Embora as interações gênicas ainda sejam difíceis de predizer e medir, o estudo que envolve marcadores moleculares apresenta méritos reconhecidos e já aplicados em diversos setores da criação animal.

Para se obter informações confiáveis do material genético de um animal é necessário que as etapas que antecedem a amplificação (replicação *in vitro*) sejam rigorosas e livres de contaminação. Muitos são os métodos desenvolvidos para obtenção de DNA puro e íntegro. Muitos são baseados em *kits* comerciais, de custos relativamente elevados. São raros os estudos que comparam métodos de extração de baixo custo, aplicáveis a amostras de material biológico obtidas por métodos não-invasivos de coleta. Na maioria dos casos, as extrações envolvem amostras obtidas por métodos invasivos, os quais, no caso de grandes animais, tornam a coleta das amostras uma tarefa difícil e demorada, que pode provocar estresse nos animais.

Em virtude dessas desvantagens, métodos alternativos têm surgido para tornar a obtenção das amostras um processo menos desgastante, tanto para o pesquisador quanto para os animais.

Extração de DNA obtida a partir de pena, pelos, sêmen congelado, entre outros, têm sido bastante usada e seus resultados são bastante promissores.

O bulbo dos pelos dos animais constitui fonte de material celular para extração de DNA. Uma das limitações é a quantidade de DNA obtida. Na maioria das vezes, a concentração é reduzida e está na dependência da espécie, da quantidade, do tempo de armazenamento e do método de preservação.

Os pelos são principalmente constituídos por queratina, pequenas quantidades de metais e pigmento, a melanina, que constitui um fator inibidor da amplificação. Dessa forma, o método de extração deve atuar preferencialmente na raiz do pelo e agir neutralizando a interferência do pigmento.

Em bovinos de raças zebuínas, Coelho et al. (2004) verificaram a concentração de DNA de pelos, considerando diferentes tempos de armazenamento e diferentes métodos de extração, e observaram concentração média de 500 µg mL<sup>-1</sup>, ausência de efeito significativo de contaminantes, como proteínas, e padrão de amplificação satisfatório, ou seja, características compatíveis com os DNAs obtidos por métodos de coletas invasivas, como é o caso do DNA extraído de células sanguíneas.

Na literatura especializada podem ser encontrados diferentes protocolos para extração e purificação do material genético dos animais.

Muitos dos protocolos mais consagrados, como os publicados por Sambrook et al. (1989), sofreram e sofrem modificações com o objetivo de se adaptarem ao material em estudo. Os ajustes são muitas vezes necessários, em função da espécie animal e do tecido com que se pretende trabalhar. Essas metodologias laboratoriais nem sempre estão associadas à praticidade e economia de tempo e dinheiro, além dos riscos de acidentes e contaminações ambientais.

Assim, o objetivo do trabalho foi comparar dois diferentes protocolos de extração de DNA de pelos de búfalos (*Bubalus bubalis*) e comparar três regiões de coleta de material no corpo do animal (nuca, paleta direita e testa).

## Material e métodos

O experimento foi realizado na Fazenda Experimental de Iguatemi, pertencente à Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná. Foram utilizados pelos de quatro animais *Bubalus bubalis*, coletados com alicate específico, tipo 'bico-de-pato' com mandíbula de 10 mm de largura e 2 mm de espaçamento (Silva, 2000). Os pelos foram retirados de três regiões do corpo: da nuca, da paleta direita e da testa. Logo que retirados, os pelos foram colocados em sacos plásticos individuais com borda adesiva, identificados e armazenados em refrigeração. Foram coletadas três repetições para cada região (nuca, paleta e testa) em cada animal, totalizando 36 amostras para cada protocolo. Para cada repetição, obteve-se um número variável de pelos e, do total de pelos coletados, foram separados 20 pelos com bulbo para extração de DNA, com a utilização de dois protocolos, escolhidos de acordo com a praticidade e o tempo gasto para obter amostras de DNA puras para PCR.

Protocolo 1 - extração de DNA pelo método de fenol-clorofórmio: aos pelos acondicionados em microtubos foram adicionados 550 µL de tampão de lise, 27 µL de SDS a 20%, 10 µL (20 mg mL<sup>-1</sup>) de proteinase K, e as amostras foram incubadas por 12h a 55°C. Foram adicionados 250 µL de fenol e 250 µL de clorofórmio, sendo as amostras centrifugadas por 3 min. a 12.000 rpm. Ao sobrenadante foram adicionados 500 µL de clorofórmio, a seguir, as amostras foram centrifugadas.

O DNA foi precipitado com a adição de 1 mL de etanol absoluto gelado na presença de 50 µL de acetato de sódio 3 M. As amostras foram armazenadas a 4°C por 1h. Após duas lavagens com 1 mL de etanol 70%, seguidas de centrifugações por 3 min. a 12.000 rpm, o DNA foi seco ao ar e

ressuspensionado com TE (10 mM de Tris pH 8,0 e 1 mM de EDTA), em banho-maria, por 1h a 55°C.

Protocolo 2 - extração de DNA com CTAB (Hexadeciltrimetilamina-ammonium bromide): os microtubos contendo os pelos foram agitados vigorosamente com 500 µL de CTAB aquecido e 6 µL de proteinase K (20 mg mL<sup>-1</sup>). As amostras permaneceram em banho-maria por 2h a 65°C. Foram adicionados 480 µL de clorofórmio e 20 µL de álcool isoamílico (24:1), as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 30 min. O sobrenadante foi descartado, e o pellet lavado com 1 mL de etanol 70%, centrifugado a 12.000 rpm por 2 min. (o processo foi repetido duas vezes). O DNA foi seco ao ar e ressuspensionado com TE (10 mM de Tris pH 8,0 e 1 mM de EDTA). Todas as amostras foram armazenadas a -20°C para uso posterior.

A quantificação das amostras foi realizada por meio de espectrofotômetro no comprimento de onda de 260 nm; a pureza, checada em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo e visualizado sob UV.

As reações de amplificação foram realizadas com a utilização de oligonucleotídeos para o gene do hormônio do crescimento de bovinos (Mitra *et al.*, 1995), em um volume de 20 µL contendo tampão Tris-KCl (Tris-HCl 20 mM pH 8,4 e KCl 50 mM), 100 ng de DNA genômico, 0,2 mM de cada dNTP, 0,5 µL de cada oligonucleotídeo iniciador (5 pM), 1U Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>.

O programa da PCR constituiu-se de uma desnaturação inicial de 95°C por 1 min., desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento dos oligonucleotídeos a 60°C por 45 segundos e uma extensão final a 72°C por 90 segundos; os ciclos foram repetidos por 35 vezes.

Para análise do tamanho dos bulbos dos pelos dos búfalos participantes deste experimento, foram utilizadas fotomicrografias obtidas em microscópio estereoscópico, mediante captura de imagem por câmera digital Canon Power Shot A95 (Zoom Browser EX 4.6).

Os resultados foram analisados utilizando-se o procedimento GLM do SAS (1993), em um delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial 2x3 (dois protocolos de extração de DNA e três regiões do corpo). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey (5%).

## Resultados e discussão

Por se tratar de uma variável muito instável, a concentração de DNA obtida por meio da leitura

espectrofotométrica foi avaliada utilizando-se a média das repetições de cada local dentro de cada animal para os dois protocolos. O coeficiente de variação obtido foi de 35,06%, que, embora alto, foi considerado satisfatório dado a natureza da característica estudada.

Foi encontrada diferença significativa ( $p < 0,05$ ) quanto aos protocolos utilizados, e o protocolo 2 (CTAB) apresentou a maior média de concentração de DNA para as amostras de pelo,  $4,38 \pm 1,70 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Tabela 1).

Entre as regiões do corpo avaliadas, pode-se notar maior concentração de DNA dos pelos retirados da testa para CTAB e dos pelos da paleta para fenol-clorofórmio, embora não tenha sido encontrada diferença estatística ( $p > 0,05$ ) entre os locais de onde os pelos foram extraídos.

Por esse motivo, sugere-se que a coleta seja feita levando-se em consideração a praticidade e a acessibilidade da região (a pé, a cavalo, com alicate, no tronco etc.), ficando na dependência de como esta será realizada.

**Tabela 1.** Média e desvio-padrão (DP) da concentração de DNA em µg mL<sup>-1</sup> para cada protocolo em cada região, com o tempo previsto por protocolo.

*Tabel 1. Average and standard deviation (DP) concentration of DNA in µg mL<sup>-1</sup> for each protocol in each region, with the time required by protocol.*

Região <i>Region</i>	Protocolos <i>Protocols</i>	
	Fenol-clorofórmio <i>Phenol-Chloroform</i>	CTAB <i>CTAB</i>
Nuca <i>Back of the head</i>	$2,148 \pm 0,789$	$4,081 \pm 1,549$
Paleta direita <i>Right shoulder</i>	$3,280 \pm 1,076$	$4,061 \pm 1,109$
Testa <i>Forehead</i>	$2,798 \pm 0,462$	$4,316 \pm 2,446$
Média ± DP <i>Average ± SD</i>	$2,742b \pm 0,777$	$4,153a \pm 1,701$
Tempo <i>Time</i>	15h 50 min.	3h 50 min.

Médias seguidas por diferentes letras minúsculas na mesma linha diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

Os búfalos não apresentam comportamento agressivo se bem manejados, isto é, se forem conduzidos com calma e sem agressões físicas. Animais criados assim são facilmente levados à mangueira para diversas averiguações. Entretanto, ainda existem animais rústicos e criadores sem experiência que tornam a captura e a contenção dos animais uma tarefa difícil, o que muitas vezes acaba inviabilizando as pesquisas.

A coleta do pelo com alicate pode ser feita pelo técnico montado a cavalo no meio do rebanho de uma forma não-invasiva, não causando o estresse nos animais.

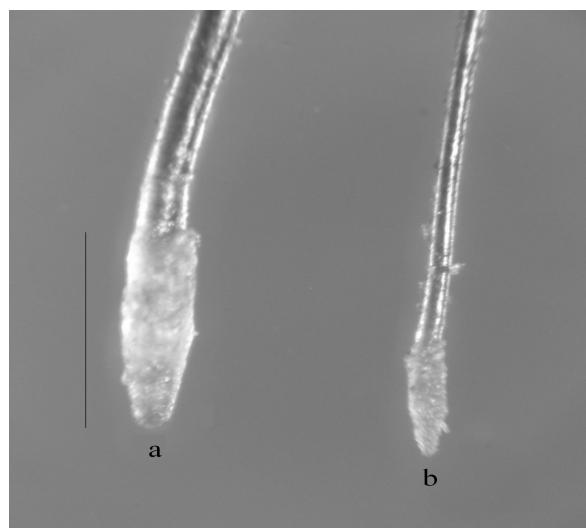
Alguns trabalhos que envolvem extração de DNA de pelos de animais revelam apenas a

eficiência ou não dos protocolos quanto à obtenção do material genético (Lacorte *et al.*, 2004). Entretanto, Coelho *et al.* (2004), também utilizando amostras de pelos de touros zebuíños, verificaram concentrações de 0,307 a 0,583  $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ , valor muito inferior ao observado neste trabalho. Entre essas duas espécies, porém, esperam-se algumas diferenças, uma vez que a distribuição, o diâmetro e a quantidade de glândulas sudoríparas encontradas nos bivalinos são diferentes das encontradas nos bovinos.

Considerando que o pelo individual conduz mais calor que o ar que o envolve, quanto mais grossa for essa fibra, maior a quantidade de calor conduzida por meio dela.

Além disso, búfalo possui pele negra, e experimentos com bovinos mostram que as áreas de pelame negro possuem pelos mais curtos, menos numerosos, com menor densidade de massa e maior diâmetro dos pelos (Maia *et al.*, 2003).

A comparação entre a estrutura do pelo dos búfalos e dos bovinos revelou uma área de bulbo muito maior para os bivalinos, o que poderia justificar a maior quantidade de DNA encontrada neste trabalho (Figura 1).



**Figura 1.** Diferença entre o bulbo de pelo de búfalo (a) e de bovino (b), barra = 2 mm.

*Figure 1. Difference between the fur bulb of buffalo (a) and cattle (b), bar = 2 mm.*

O método de coleta e armazenamento em saquinhos individuais mostrou-se eficiente, por permitir separação rápida e bem identificada, evitando perdas e contaminações do material genético.

Coelho *et al.* (2004) indicaram que o material armazenado apenas em refrigeração não se diferencia do material congelado e também que o DNA

extraído do bulbo do pelo apresenta concentrações suficientes para avaliação, assim como o DNA extraído do sangue ou do sêmen.

Não foi verificado efeito no nível de contaminação do DNA em função do protocolo e do local de coleta (Figura 2). O protocolo 1 (fenol-clorofórmio) apresentou média da razão de  $A_{260}/A_{280}$   $^{-1}$  nm igual a 1,7; o protocolo 2 (CTAB), igual a 2,0. A leitura  $A_{260}$  nm permite o cálculo da concentração de ácidos nucleicos na amostra. A relação entre as leituras espectrofotométricas a  $A_{260}$  e  $A_{280}$  nm ( $DO_{260}/DO_{280}$   $^{-1}$ ) fornece uma estimativa da pureza dos ácidos nucleicos.

Os valores referenciais obtidos em soluções puras de DNA e RNA possuem valores  $DO_{260}/DO_{280}$   $^{-1}$  de 1,8 e 2,0, respectivamente (Sambrook *et al.*, 1989). Valores inferiores apontam contaminações, principalmente com relação à proteína.

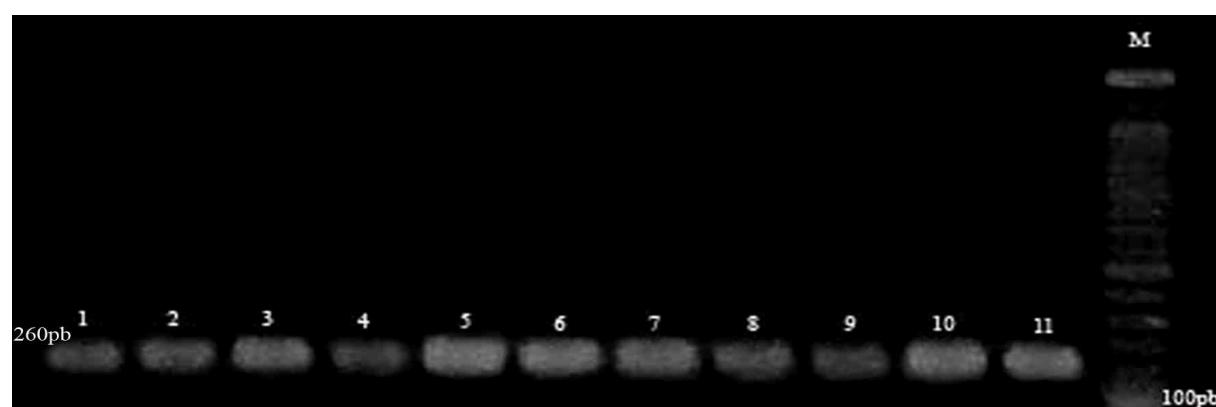
Embora o valor encontrado seja menor, não houve interferência nas reações de amplificação, apontando a eficiência dos protocolos que utilizam a proteinase K. Todas as amostras apresentaram padrão amplificação com a utilização dos oligonucleotídeos para o GH (Figura 3). Conclui-se, portanto, que o DNA obtido de amostras de pelos de búfalos pode ser utilizado sem prejuízo nos procedimentos moleculares.



**Figura 2.** DNA de búfalos extraídos com dois diferentes protocolos, Fenol-clorofórmio (protocolo 1) e CTAB (protocolo 2). M: Marcador molecular, 100 pb; 1-3 Protocolo 2; 4-6 Protocolo 1.

*Figure 2. DNA extracted from buffalo with two different protocols, Phenol-chlorofórm (protocol 1) and CTAB (protocol 2). M: molecular markers, 100bp; 1-3 Protocol 2; 4-6 Protocol 1.*

Quanto à praticidade de utilização dos dois métodos de extração de DNA avaliados, além de ter apresentado maior concentração de DNA, o protocolo 2 apresentou menor tempo de execução, 3h 50 min., em comparação a 15h 50 min., e evitou a utilização de mais um reagente tóxico, como é o caso do fenol.



**Figura 3.** Amplificação do DNA do pelo de búfalo de cada região para cada protocolo. M: Marcador molecular, 100 pb; 1 a 6: protocolo 1 (fenol-clorofórmio); 7 a 11: protocolo 2 (CTAB); 1, 2, 7 e 8 são da nuca; 3, 4, 9 e 10 são da paleta direita; 5, 6 e 11 são da testa.

**Figure 3.** Amplification of DNA from buffalo fur in each region for each protocol. M: molecular markers, 100pb; 1 to 6, Protocol 1 (phenol-dichloroform); 7 to 11, protocol 2 (CTAB); 1, 2, 7 and 8 are from the Back of the head; 3, 4, 9 and 10 are from the Right shoulder; 5, 6 and 11 are from the forehead.

## Conclusão

O protocolo que utiliza o CTAB se mostrou eficiente para a extração de DNA de pelos de búfalos apresentando amplificação positiva em todas as amostras. Sugere-se a aplicação do CTAB pela praticidade e pelo tempo de execução, quando se utilizam pelos de búfalos para obtenção de material genético. Em relação ao local de retirada dos pelos, propõe-se que a coleta seja efetuada na região da testa, levando-se em consideração a praticidade e a acessibilidade aos pelos.

## Referências

- ABCB-Associação Brasileira dos Criadores de Búfalos. *Criação de búfalos*. Disponível em: <<http://www.bufalo.com.br>>. Acesso em: 18 nov. 2008.
- BÚFALOS no Brasil: IBGE projeta 54 milhões em 2006. *Imagen Rural Leite*, São Paulo, v. 4, n. 43, p. 53, 1997.
- COELHO, E.G.A. et al. Comparação entre métodos de estocagem de DNA extraído de amostras de sangue, sêmen e pêlos e entre técnicas de extração. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, Belo Horizonte, v. 56, n. 1, p. 111-115, 2004.
- LACORTE, G.A. et al. Extração não-invasiva de DNA de *Equus caballus*: Uma avaliação de métodos. In: SIMPÓSIO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MELHORAMENTO ANIMAL, 5., 2004, Pirassununga. *Anais...* Pirassununga: SBMA, 2004. p. 1-3.
- MAIA, A.S.C. et al. Características do pelame de vacas Holandesas em um ambiente tropical: um estudo genético e adaptativo. *Rev. Bras. Zootecn.*, Viçosa, v. 32, n. 4, p. 843-853, 2003.
- MITRA, A. et al. Polymorphisms at growth hormone and prolactin loci in Indian cattle and buffalo. *J. Anim. Breed. Gen.*, Finland, v. 112, n. 1, p. 71-74, 1995.
- NASCIMENTO, C. *Criação de búfalos: alimentação, manejo, melhoramento e instalações*. Brasília: Embrapa/SPI, 1993.
- SAMBROOK, J. et al. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SAS Institute. *SAS user's guide: statistics*. Cary, 1993.
- SILVA, R.G. *Introdução à bioclimatologia animal*. São Paulo: Nobel, 2000.

Received on August 27, 2008.

Accepted on December 10, 2008.

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.