



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL**

Luciana Amaral de Mascena Costa

**ANÁLISE DO POLIMORFISMO NO GENE DA LEPTINA EM
BÚFALAS DA RAÇA MURRAH NOS ESTADOS DE
PERNAMBUCO E ALAGOAS E NA RELAÇÃO COM A
PRODUÇÃO LEITEIRA**

**RECIFE
2015**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL**

Luciana Amaral de Mascena Costa

**ANÁLISE DO POLIMORFISMO NO GENE DA LEPTINA EM
BÚFALAS DA RAÇA MURRAH NOS ESTADOS DE
PERNAMBUCO E ALAGOAS E NA RELAÇÃO COM A
PRODUÇÃO LEITEIRA**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal Tropical.

Orientador: Prof Dr. Manoel Adrião Gomes Filho

Co-orientadora: Prof Dra. Maria de Mascena Diniz Maia.

**RECIFE
2015**

Ficha Catalográfica

C837a Costa, Luciana Amaral de Mascena
Análise do polimorfismo no gene da Leptina em búfalas da
raça Murrah nos Estados de Pernambuco e Alagoas e na sua
relação com a produção leiteira / Luciana Amaral de Mascena
Costa. -- Recife, 2015.
52 f.: il.

Orientador (a): Manoel Adrião Gomes Filho.
Dissertação (Mestre em Ciência Animal tropical) –
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento
de Morfologia e Fisiologia Animal, Recife, 2015.
Inclui apêndice(s), anexo(s) e referências.

1. Bubalino 2. Gene da leptina 3. Leite 4. Polimorfismo
I. Gomes Filho, Manoel Adrião, orientador II. Título

CDD 591.4

ANÁLISE DO POLIMORFISMO NO GENE DA LEPTINA EM BÚFALAS DA RAÇA MURRAH NOS ESTADOS DE PERNAMBUCO E ALAGOAS E NA RELAÇÃO COM A PRODUÇÃO LEITEIRA

“Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal Tropical, outorgado pela Universidade Federal Rural de Pernambuco, à disposição na Biblioteca Central nesta Universidade. A transcrição ou utilização de trechos deste trabalho é permitida, desde que respeitadas às normas éticas científicas.”

Luciana Amaral de Mascena Costa
Discente

Prof. Dr. Manoel Adrião Gomes Filho
Orientador/Presidente
Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)

Prof. Dra. Aurea Wischral
Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)

Prof. Dra. Ellen Cordeiro Bento da Silva
Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)

Prof. Dr. Paulo Roberto Eleutério de Souza
Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Jaqueline Nóbrega Amaral de Mascena (*in memoriam*) e José de Mascena Lima (*in memoriam*), que mesmo de longe estão sempre presente em minha vida, sendo o motivo da minha dedicação em tudo que eu faço.

Dedico também ao meu Esposo Allan Costa pelo incentivo e carinho, sendo esse companheiro fiel e leal, que nos momentos difíceis me estende a mão e me ajuda a levantar, seguindo ao meu lado incondicionalmente.

*“Não sabendo que era impossível, ele foi lá e fez”
(Jean Cocteau)*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me permitido concluir este trabalho, derramando sobre mim todo seu amor e misericórdia.

Aos meus pais, José de Mascena Lima (*in memoriam*) e Jacqueline Nóbrega Amaral de Mascena (*in memoriam*), por serem responsáveis por tudo que sei e que sou hoje, por sempre me educaram e com todo o amor que eu poderia receber. Por isso, mesmo de longe, ainda sinto esse amor tão presente em minha vida.

Ao meu esposo Allan Costa, Por todo amor, apoio e dedicação, me incentivando em tudo que decido fazer, durante esses 13 anos de relacionamento.

Aos meus irmãos Ana Alice e José de Mascena e minhas sobrinhas Maria Eduarda e Letícia, por entenderem a minha ausência, sempre me dando amor e carinho.

Ao meu Orientador Manoel Adrião por toda a dedicação e apoio ao trabalho que realizamos, sempre me incentivando e me ajudando em tudo.

Aos meus amigos do Laboratório, Diogo, Diego, Ellen e aos amigos da vida, Jamilly por tirar minhas dúvidas e sempre ajudar em tudo que podia, pelas nossas risadas e pelo companheirismo e, em especial, meu agradecimento à amiga Ericka por está ao meu lado no laboratório diariamente me ajudando em tudo, tanto no trabalho de bancada como intelectualmente, sem ela meu trabalho teria sido bem mais difícil.

Aos meus amigos da vida Manuela, Witassy, Gleibisiele, Ivana, Emmanuel, Falcão, Fragoso e Raposo pelo carinho, risadas, conversas e pela amizade sempre aguentando minhas lamentações e me incentivando a seguir em frente.

A minha tia Maria de Mascena por está sempre presente na minha vida acadêmica e pessoal me dando todo o apoio e amor.

Ao Professor Paulo Souza por sempre estar disposto a me ajudar, tirando minhas dúvidas todas as vezes que fui procurá-lo.

Aos meus amigos de turma do mestrado Alex, Juliana, Thiago pelo companheirismo e amizade.

LISTA DE ABREVIATURAS

ABCB - Associação Brasileira de Criadores de Búfalos

AFLP- Polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados

FAO - Organização das Nações Unidas para Alimentação

MU- Murrah

PCR- Reação em Cadeia da Polimerase

PCR-RFLP- Reação em Cadeia da Polimerase - Polimorfismo com Fragmento de Restrição.

RAPD- Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso

SNP- Restriction Fragment Length Polymorphism.

LISTA DE FIGURAS (DISSERTAÇÃO)

- | | | |
|----------|---|----|
| Figura 1 | As quatro raças bubalinas mais comum do Brasil. | 10 |
| Figura 2 | Representação gráfica do efetivo de bubalinos segundo as grandes regiões do Brasil. | 14 |

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Tabela 1 – Distribuição genotípica do polimorfismo do gene da leptina 1620 (A/G) em búfalas da raça Murrah de duas fazendas da região nordeste de Brasil (Pernambuco-PE e Alagoas- AL).	43
Tabela 2	Análise das variáveis de lactação relacionados com polimorfismo no gene da leptina 1620 (A/G) em búfalas de raça Murrah em de duas fazendas da região nordeste de Brasil (Pernambuco-PE e Alagoas- AL). (n=139)	44
Tabela 3	Análise entre as variáveis: quantidade de lactação e dias de lactação com o polimorfismo no gene da leptina entre búfalas de raça Murrah duas fazendas do Nordeste do Brasil (Pernambuco-PE e Alagoas- AL)	45
Tabela 4	Análise das variáveis: litros de lactação, dias de lactação, número de lactações, pico da produção e peso ao nascer na fazenda “F” por genótipo.	46

RESUMO

Atualmente, tem havido busca por marcadores moleculares a serem utilizados em programas de seleção para que atuem de forma complementar a seleção clássica, o que permite uma antecipação das avaliações nos animais, otimizando o sistema de seleção genética voltada à produção animal. O hormônio leptina e seus receptores são expressos principalmente nos adipócitos e estão relacionados com o controle da ingestão de alimentos, uso da energia e indicador da condição nutricional do organismo que influenciam em ações de outros sistemas fisiológicos, como produção de leite. Diante disso foi objetivado investigar a existência do polimorfismo *LEP-1620 (A/G)* no gene que codifica o hormônio da leptina em búfalas e suas possíveis associações com a produção leiteira em dois estados do Nordeste do Brasil, Pernambuco e Alagoas. O DNA foi extraído a partir de amostras de sangue coletado por venopunção da veia coccígea dos 139 búfalas das duas fazendas da região Nordeste. Após a extração de DNA, essas amostras foram genotipadas pela técnica PCR-RFLP. Foram encontrados os genótipos AA(21%), AG(50%), GG(29%). Sendo que o genótipo AG associado com uma maior produção de leite para a fazenda Alagoas quando comparada com a fazenda Pernambuco ($p= 0,001$). Porém, os genótipos apresentados neste estudo, não foram associados às variáveis analisadas para dias de lactação e produção média diária.

Palavras chave- bubalino, gene da leptina, leite, polimorfismo

ABSTRACT

Currently, there have been search for molecular markers in animal selection programs which could help in the classic selection, anticipating the evaluations of the animals and optimizing the genetic selection system focused on production. The hormone leptin and its receptors are mainly expressed in adipocytes and related to the control of food intake, energy use and indicator of nutritional conditions of the body that influence the actions of other physiological systems, such as milk production. Thus the present study aims to investigate the existence of LEP 1620 polymorphism (A / C) in the gene encoding the hormone leptin in buffaloes and their possible association with milk production in the Northeast region of Brazil. DNA was extracted from blood samples collected from the tails of animals. Blood samples were collected from 139 buffaloes from two farms in the Pernambuco and Alagoas. After DNA extraction, the samples were genotyped by PCR-RFLP technique. The AA, AG, GG were found. Since the AG genotype was associated with a higher milk production for the farm A when compared to farm Pernambuco. However, the genotypes presented in this study were not associated with variables for days in milk and average daily production. However, other leptin gene polymorphisms can be studied with a view to search for a marker, since there are few studies associated with this type buffalo.

Key- words buffalo, the leptin gene, milk, polymorphism

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	6
2 REVISÃO DE LITERATURA	8
2.1 Búfalos	8
2.2 Raça Murrah	10
2.3 A bubalinocultura no Brasil e no mundo	11
2.4 Leite de búfala	15
2.5 Polimorfismo Genético	16
OBJETIVO GERAL	22
Objetivos Específicos	22
Referências Bibliográficas	23
ARTIGO	32

1. INTRODUÇÃO

Os Bubalinos foram introduzidos no Brasil a partir do final do século XIX, predominantemente em pequenos lotes originários da Ásia, Itália e Caribe, pela ilha de Marajó, estado do Pará, e expandiram para todas as regiões e territórios nacionais (ABCB, 2009). Em todo o mundo, foram descritas, aproximadamente, 19 raças de búfalo. No Brasil, quatro raças possuem seu padrão definido pela Associação Brasileira dos Criadores de Búfalo (ABCB): Murrah (indiana), Jafarabadi (indiana, com as variedades Gir e Palitana), Mediterrâneo (origem italiana) e Carabao (sudeste asiático).

O Brasil possui uma das maiores populações de búfalos do mundo, com aproximadamente 1,2 milhões de cabeças (IBGE, 2010), representando o maior rebanho bubalino entre os países ocidentais. Entre os anos de 1997 e 2007, a produção mundial de leite de búfala apresentou um aumento de 43% (BREDA, 2010), porcentagem superior à reportada para vacas leiteiras no mesmo período, que foi de 20% (FAO, 2009). O leite de búfala tem excelentes qualidades físico-químicas devido a alta concentração de seus componentes (TONHATI, 2000a; ROSATI e VAN VLECK, 2002; ASPILCUETA-BORQUIS, 2010), sendo caracterizado por altas porcentagens de gordura e proteína.

Para um bom aproveitamento e seleção de um rebanho que forneça o melhor leite, em bovinos procuram relacionar polimorfismos genéticos com a qualidade do leite, porém, poucos trabalhos desse tipo são feitos com búfalos. (ZETOUNI, 2013). Marcadores moleculares são pequenas regiões do DNA que apresentam polimorfismo entre indivíduos de uma mesma espécie e que podem ser relacionados às variações fenotípicas de características quantitativas de interesse econômico. Um gene pode estar em associação direta a um marcador molecular facilitando a sua identificação (HAYWARD, 1994). Assim desenvolvimento de marcadores moleculares aumenta a eficiência da seleção, já que tais marcadores podem fornecer maior quantidade de informação sobre os valores genéticos dos animais (ZETOUNI, 2013).

Várias pesquisas foram realizadas na tentativa de identificar marcadores moleculares associados à produção do leite de búfalas (MITRA, 1998; REN, 2011; COSENZA, 2009;), embora estudos com o gene da leptina de búfalos são pouco encontrados na literatura. O gene da leptina, por exemplo, foi descoberto através de

estudos com camundongos obesos, estéreis e deficientes em leptina (ZHANG, 1994), e tem sido considerado como gene candidato para associação com características quantitativas de interesse econômico em diversas espécies de animais domésticos, como deposição de gordura na carcaça (BUCHANAN, 2002), balanço energético, produção de leite, peso vivo e fertilidade (LIEFERS, 2002), entre outras.

Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo verificar a existência do polimorfismo *LEP-1620 (A/G)* em búfalas da raça murreh e suas possíveis correlações com produção leiteira.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Búfalos (*Bubalus bubalis*)

Os búfalos são classificados taxonomicamente na ordem *Artiodactyla*, subordem *Ruminantia*, família *Bovidae*, subfamília *Bovinae* e gênero *Bubalus*. O gênero *Bubalus* está dividido em dois grandes grupos: os *Bubalus bubalis bubalis*, com número de cromossomos igual a $2n = 50$, conhecidos como búfalos de rio (river buffalos) e *Bubalus bubalis kerebau*, com número de cromossomos igual a $2n = 48$, sendo estes conhecidos como búfalos do pântano (swamp buffalos) (CARROLL, 1988).

A espécie bubalina é considerada pela Organização das Nações Unidas para Alimentação (FAO) como o animal doméstico mais dócil do planeta quando domesticados, podendo também adaptar-se a todas as latitudes e longitudes, nas mais variadas condições climáticas, do frio da Europa Oriental aos desertos da África, nas regiões tropicais da Amazônia, nos sertões nordestinos e nas diferentes altitudes, desde as planícies às áreas montanhosas (FAO, 200; SILVA, 2003).

Estes animais são versáteis sob condições pastejo extensivo e por terem essa característica de serem criados nas mais diversas condições climáticas, muitas vezes, apresentam-se como uma alternativa para o aproveitamento de áreas da propriedade, às quais os bovinos não se adaptam. A preferência por regiões alagadas ou áreas pantanosas é bastante peculiar para a espécie; isto ocorre porque os búfalos possuem um menor número de glândulas sudoríparas em relação aos bovinos e sua pele escura apresenta uma espessa camada de epiderme, fazendo com que eles sejam menos eficientes na termorregulação corpórea. Assim, eles procuram a água para se refrescarem e para se protegerem do ataque de insetos e parasitos, motivo pelo qual, segundo Thomas (2004), o *Bubalus bubalis* também é chamado de búfalo aquático (DAMASCENA, 2010).

No Brasil, as raças de búfalos mais comumente encontradas são Mediterrâneo, Murrah, Jafarabadi, sendo estes búfalos encontrados em rio e Carabao, búfalo de pântanos (Figura 1).

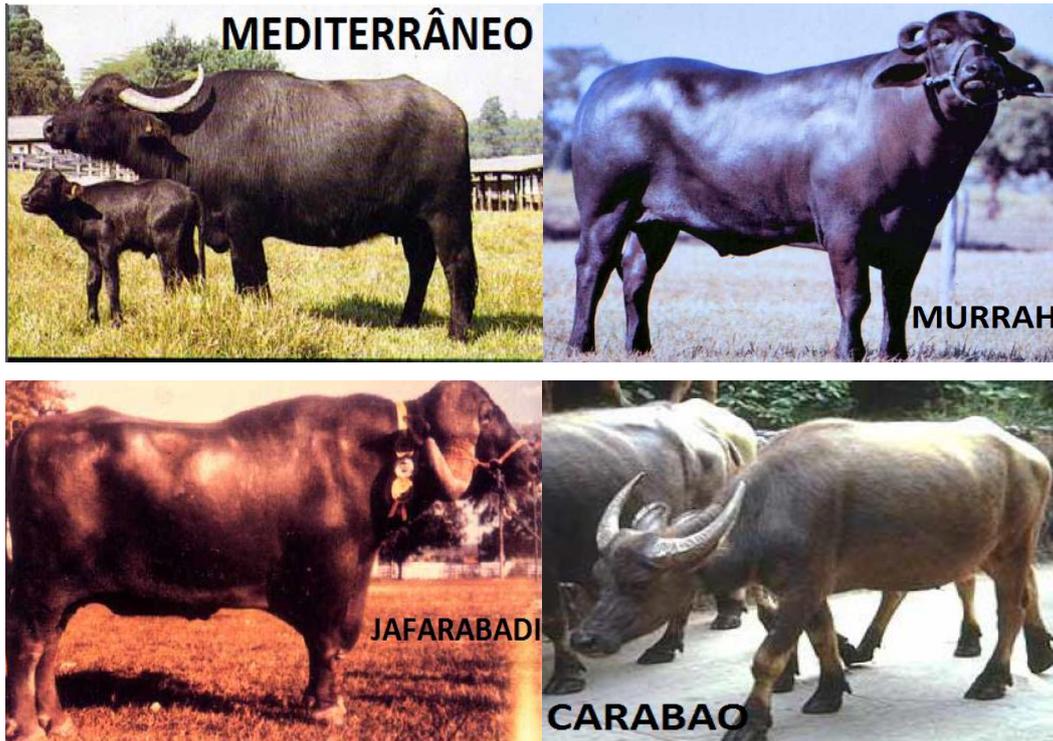
A raça Mediterrâneo é oriunda da italiana, sendo animais que podem ser aproveitados tanto na produção leiteira quanto no aproveitamento de sua carne. Apresentam porte médio e são medianamente compactos. Devido à sua origem,

esses animais são também conhecidos como búfalo preto ou italiano, importado em diversas épocas, da Itália para Ilha de Marajó e, em seguida, para diversos pontos do País. Possui uma aparência que se assemelha tanto a raça Murrah quanto a Jafarabadi, possuindo também uma pelagem preta. O padrão da raça Mediterrâneo, no Brasil, de acordo com a ABCB (Associação Brasileira de criadores de bufalos), é: cabeça na posição fronto-nasal, com perfil craniano convexo e chanfro de retilíneo a sub-côncavo. As fêmeas possuem um peso de aproximadamente 550 kg e os machos 750 kg. Apresentam pelagem com forte correlação entre a cor dos pelos e da pele em todo o corpo, sendo pretos os pelos e a pele. A cor preta estende-se também aos chifres, cascos, espelho nasal e mucosas aparentes. É uma raça de dupla aptidão (leite e carne), embora os mediterrâneos brasileiros sejam utilizados para a produção de carne. (ABCB, 2014)

Jafarabadi é uma raça Indiana, Originária da Floresta de Gir, península Kathiavar, é a raça menos compacta e de maior porte que existe no mundo, com chifres mais longos, caídos e voltados para cima de espessura menor, com uma curvatura longa e harmônica. Segundo a ABCB a raça é padronizada da seguinte forma: a cabeça tem posição fronto-nasal, com perfil craniano ultra convexo e chanfro de retilíneo a sub-convexo. Seus Chifres são longos, fortes e grossos, de seção ovalada ou triangular, dirigidos para trás e para baixo, com curvatura final para cima e para dentro, em harmonia com o perfil craniano. O peso médio é de 500 a 1.200 Kg nos machos (às vezes até 1.500 kg) e nas fêmeas de 450 a 900 kg. A pelagem possui forte correlação entre a cor dos pelos e da pele em todo o corpo, sendo pretos os pelos e a pele. (ABCB, 2014)

A raça Carabao é de origem Italiana. É a única adaptada às regiões pantanosas, estando concentrada na ilha de Marajó, no Pará; originária do norte das Filipinas. Apresenta pelagem mais clara, cabeça triangular, chifres grandes e pontiagudos, voltados para cima, porte médio, medianamente compactos e dupla aptidão. (DAMASCENA, 2010).

Figura 1- As quatro raças bubalinas mais comuns no Brasil.



Fonte: <http://www.reproducao.ufc.br/bubalinos.pdf>

2.2 Raça Murrah

No Brasil a raça Murrah (MU) tem uma distribuição uniforme por diversas regiões, principalmente nos sistemas de criação mais intensivos e/ou controlados, adaptados ao hábito mais calmo desses animais. O nome Murrah vem do Hindu e significa caracol, sendo este termo referente ao formato espiralado dos chifres nesta raça. (MANO FILHO, 1985)

Esta raça foi padronizada no Brasil pela ABCB sendo descritos da seguinte forma: cabeça na posição fronto-nasal, com perfil craniano retilíneo ou levemente sub-convexo e chanfro de retilíneo a sub-côncavo. O peso médio dos machos é de 450 a 900 kg e as fêmeas na faixa de 350 até 700 kg. A pelagem tem forte correlação entre a cor dos pêlos e da pele em todo o corpo, sendo pretos os pelos e a pele. A coloração preta estende-se também aos chifres, cascos, espelho nasal e mucosas aparentes. A vassoura da cauda é branca, preta ou, ainda, mesclada. A raça Murrah, nos rebanhos mais fechados, apresenta-se com a morfologia corporal “melhor acabada” em conformação com pouca variabilidade de forma. (ABCB, 2014)

Os primeiros rebanhos bubalinos dessa raça, no Brasil tiveram uma base genética bastante estreita, o que é demonstrado pelas poucas importações realizadas, contudo, em muitos casos, foi ampliada pela introdução de genes da raça Mediterrâneo, que confere uma variabilidade que muitas vezes é observada na conformação corporal desses animais, caracterizando-se como uma variedade distinta. Quando fechado, o conjunto gênico Murrah apresenta muitos problemas congênitos tais como: atresias, paralizações, espasmos, dentre outros, resultado da endogamia, sendo reflexo direto da pouca variabilidade existente na base genética do rebanho Murrah brasileiro. Algumas novas introduções, denominadas de “nova opção”, aumentaram esta base e, conseqüentemente, a variabilidade da raça. No entanto, não se conhece a procedência desses germoplasma, dificultando uma análise mais profunda e concreta das gerações futuras. Para que os efeitos de um trabalho de melhoramento sejam sentidos, deve-se efetuar rigorosa seleção dentro do grupo genético que está sendo trabalhado, principalmente pelo uso de animais com menor grau de parentesco possível. (ABCB, 2014)

Apesar da raça Murrah ser criada sem problemas em sistemas extensivos e de conviver tranquilamente em ambientes naturais, esta é mais adaptada aos sistemas com maior controle de pastagens cultivadas em terra firme e de boa qualidade, para maior aproveitamento de sua aptidão leiteira. Tal fato é facilitado pelo temperamento dócil dos animais. (LOURENÇO, 2000)

2.3 A Bubalinocultura no Brasil e no Mundo

O Búfalo doméstico (*Bubalus bubalis*) é um animal originário da Índia, país do continente asiático, com localização geográfica entre os paralelos 2° Sul e 31° Norte e da linha equatorial, o qual abrangem zonas Tropical e Temperada. Por consequência de sua origem, os búfalos se adaptam bem a todas as condições climáticas e geológicas típicas destas regiões (Campanile e Balestrine, 2002). Sua domesticação se deu entre os anos 2500 e 1400 a.c., o que denota em uma longa história de relação com o homem. Desde então, a criação de bubalinos se espalhou pelo mundo, gerando fontes de alimentação de alto valor biológico, como leite, carne e força de trabalho, principalmente para populações de países pobres e em desenvolvimento (COCKRILL, 1984).

A bubalinocultura vem crescendo em todo o mundo e ocupa um papel significativo na produção de alimento nos países em desenvolvimento, localizados em sua maioria nas áreas tropicais. Assumem também um relevante papel no desenvolvimento social e econômico na Índia, Paquistão, Filipinas, Vietnã, Malásia e Tailândia, encontrando-se, dessa forma, em significativa expansão em muitos países do mundo (BORGHESE, 2005).

A população de búfalos no mundo totaliza 200 milhões de animais, que estão distribuídos geograficamente na seguinte proporção; 190 milhões na Ásia (97,2%), 3,8 milhões na África (1,95%), 1,3 milhões (0,66 %) na América, 380.527 na União Européia (0.19 %) e 210 na Oceania (0.0) (FAO, 2014).

No continente asiático, os países que apresentam a bubalinocultura de forma expressiva são Índia, Paquistão e China. Assim como o Brasil, estes são países que estão em crescente neste contexto, sendo assim, a bubalinocultura surge como uma atividade promissora, embora ainda com uso de pouca tecnologia. (VILELA e SANTINI 2010)

Baseado no documento “Bubalinocultura na Índia”, produzido pela Câmara de Comércio Indústria e Agropecuária Índia-Brasil, na Índia, a criação bubalina pode ser aproveitada nas mais diversas atividades econômicas. Um dos setores de maior relevância é o leiteiro. Considerando que, 55% do leite produzido advém de búfalos, se concentrando particularmente na região nordeste do país. As raças mais conhecidas por produção de leite no país são Murrah, Nili-Ravi, Jafarabadi, Mehsana e Surti. Das 45 milhões de toneladas de leite bubalino produzidas na região Ásia/Pacífico, 30 milhões de toneladas (cerca de 70%) são produzidas na Índia. (BASTIANETTO,2009)

A criação de búfalos com a finalidade de utilizá-los para produção de carne, também é bastante significativa na Índia. Segundo dados da FAO, entre os anos de 1980 e 2000 o total de animais abatidos para utilização de sua carne quase que dobrou (aumentando de 66.299,600 para 106.239,000 cabeças). Cerca de 20% da população de búfalos é produzida para este fim. Uma grande parte da carne produzida na Índia é destinada a exportações, tendo em vista as restrições ao consumo de carne na sociedade. A Índia exporta mais de 500.000 MT (1MT = 1000 Kg) de carne em geral. Desse total, 288.027 MT foram destinados à exportação de carne bubalina em 2001, sendo o país o quinto maior exportador mundial do produto. Dentre os maiores importadores da carne bubalina indiana estão Malásia,

Filipinas, Emirados Árabes Unidos, Egito, Jordânia, Ilhas Maurício, dentre outros (BASTIANETTO et al,2009).

Na África, o Egito possui o maior rebanho de búfalos sendo ele de 3,8 milhões de cabeças, já na Europa e Itália destacam-se com 365 mil cabeças (FAO, 2014).

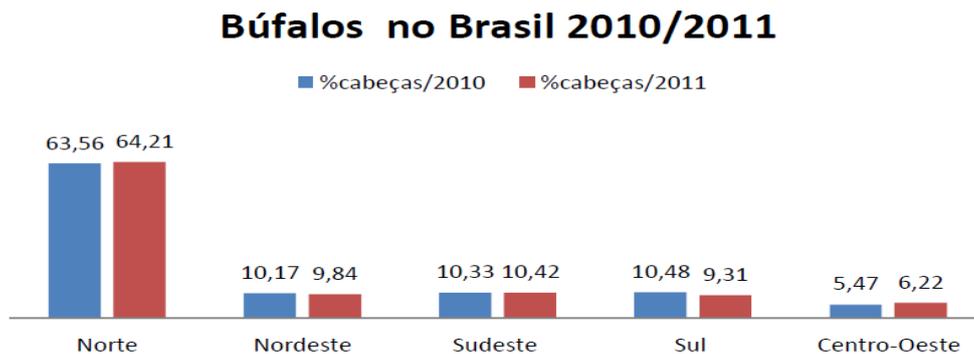
No continente Americano, mais especificamente na América do sul, o Brasil é possuidor do maior rebanho bubalino, seguido pela Venezuela, Argentina e Colômbia, sendo esta uma atividade recente no Brasil. (VALLE, 1999; VILELA E SANTINI, 2010)

Esses animais chegaram ao Brasil, pela ilha de Marajó, estado do Pará, no século XIX, advindos da Ásia, Europa (Itália) e Caribe de forma desordenada e depois se expandiram para todas as regiões e territórios nacionais. Citações bibliográficas e documentos históricos relatam a introdução de bubalinos no território brasileiro tanto por meio da importação oficial de animais com origem e capacidade produtiva reconhecida, quanto através de animais, sobreviventes ao naufrágio de embarcações que transportavam escravos da África para as Guianas, na América Central. Esses animais tinham sua capacidade produtiva desconhecida e eram transportados nos porões das embarcações. As poucas referências que tratam da introdução da espécie bubalina no Brasil, citam um número total de 500 animais. (BASTIANETTO, 2009; TONHATI, 1999; MIRANDA, 1986; FONSECA, 1986). Esses animais foram introduzidos inicialmente no Brasil apenas por constituírem uma espécie exótica. Mas, após alguns anos foram observadas boas características desse rebanho, tais como adaptação e tolerância ambiental, elevada fertilidade e baixo índice de mortalidade, entre outras (BERNARDES, 2009; BASTIANETTO, 2009).

O Brasil possui o maior rebanho de búfalos da América (LAZZARI,2010; FAO, 2014) com aproximadamente 1.277.200 cabeças (2012) dados da FAO (2014). A criação de bubalinos está presente em todas as regiões do Brasil, contudo de acordo com os dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, a maior representatividade desse rebanho encontra-se nas regiões Norte e Nordeste do país, particularmente nos estados do Pará (38%), Amapá (18,4%) e no Maranhão (6,5%). Entre 2010 e 2011, foi observado um aumento de 7,8% na população de bubalina no Brasil, com destaques para o crescimento nas Regiões Norte (8,9%), Sudeste (8,8%) e Centro-Oeste (22,6%) e reduções de 4,6% nas Regiões Nordeste e 4,2% na Região Sul. (figura-2). Contudo, pode-se observar um crescimento da

bulbalinocultura no Brasil, e conseqüentemente para a produção de leite e carne destes animais o que só vem a acrescentar ao agronegócio brasileiro (IBGE, 2011).

Figura 2 - Representação gráfica do efetivo de bubalinos segundo as grandes regiões do Brasil.



Fonte: Adaptado do IBGE

O aumento da população bubalina no Brasil está diretamente relacionado a algumas peculiaridades do leite destes indivíduos em relação ao das demais espécies domésticas. Os búfalos são economicamente superiores aos zebuínos, pois cada litro de leite produzido apresenta um custo reduzido, quando comparado ao dos bovinos, devido ao fato de serem bastante rústicos (VERRUMA-BERNARDI, 2006). O leite bubalino possui elevados níveis de sólidos totais, gordura, proteína, cálcio e fósforo presentes, que aumentam o rendimento na elaboração de queijos, produtos fermentados, leite em pó, manteiga, doce de leite e sorvete (FAO, 1991).

As propriedades físico-químicas e microbiológicas do leite de búfala possuem uma superioridade nutricional do mesmo em relação ao leite bovino, independentemente do fator ambiental envolvido. Tanto o leite quanto a carne bubalina possuem em sua composição química, percentuais de nutrientes que atendem as exigências estabelecidas para o consumo humano (MALHADO, 2005). Os búfalos são animais que possuem um melhor aproveitamento das forragens e resistência às mais diversas doenças (NASCIMENTO e CARVALHO, 1993), além de vantagens relacionadas a longa vida produtiva e reprodutiva dentro do rebanho (MALHADO, 2008).

Huhn e colaboradores (1986) afirmaram que o leite de búfala possui 33% menos colesterol, 48% a mais de proteína, 59% de cálcio e 47% de fósforo do que o

leite bovino. Sousa (2002) afirmaram ainda que o rendimento industrial do leite bubalino é 40% superior ao leite bovino, sendo de extrema importância no total aproveitamento da fabricação de derivados lácteos. (LIRA, 2009), revelaram que o soro de leite de búfala apresentou teores médios de proteína, gordura e lactose acima das médias encontradas no soro de leite de vaca. Verruma-Bernardi et al. (2006) traçaram um Mapa Interno da Preferência entre seis iogurtes produzidos com leite de vaca e búfala e verificaram a preferência pelo iogurte de leite de búfala em 100% dos consumidores entrevistados. Apesar da importância nutricional e funcional de todos os constituintes do leite, Madalena (2000) os componentes gordura e proteína são considerados de maior valor econômico dentro dos programas de pagamento de leite por qualidade.

2.4 Leite de búfala

A produção mais importante da bubalinocultura é, sem dúvida, a leiteira, que varia segundo o país e região. Na Índia, por exemplo, são relatadas, produções diárias de 7-8 Kg, em lactações com duração de 285 dias. Na Bulgária, vários rebanhos apresentam médias diárias de produção de aproximadamente 12 kg. No Brasil, temos a recordista nacional de produção de leite, a búfala Limeira, com a marca de 4654 kg na segunda da lactação (RUSSO, 1986).

O leite de búfala apresentam características muito próprias e que permitem sua fácil identificação sob o ponto de vista físico-químico e organoléptico. Possui acentuadas diferenças em relação ao leite de vaca e estas se manifestam desde o colostro, com um sabor característico, ligeiramente adocicado e a sua coloração é branco opaco, devido a ausência quase total de pigmentos de caroteno (pro-vitamina A), em sua gordura (BENEVIDES, 1998).

É na qualidade do leite bubalino que realmente reside sua maior vantagem. Quando comparado com leite, apresentando, deste modo, menos água e mais matéria seca, possuindo maiores teores de proteínas, gorduras e minerais. Entretanto, é aproveitamento industrial que esta sua grande importância, por proporcionar produtos lácteos de alta qualidade comparados ao leite bovino, como, por exemplo, mozzarella e iogurte. Seu rendimento industrial é considerável, chegando, comparativamente, a levar vantagem sobre o rendimento do leite bovino em mais de 40% (Nader Filho, 1984).

Os bubalinos exibem produtividade leiteira economicamente superior aos zebuínos. Isto é, cada litro de leite é produzido a menor custo, não só por apresentar freqüentemente maior produção por animal, maior número de fêmeas em lactação por ano, mas também evidenciar, sobretudo, rusticidade extraordinária, aproveitando melhor forragem de qualidade inferior e resistindo às mais adversas condições climáticas, com marcante resistência às doenças (NASCIMENTO E CARVALHO, 1993).

Para um bom aproveitamento e seleção de um rebanho que forneça o melhor leite, estudos genéticos em qualidade de leite em bovinos procuram relacionar polimorfismos genéticos com a qualidade do leite, porém, poucos trabalhos desse tipo foram feitos com búfalos (ZETOUNI, 2013).

2.5 Polimorfismo Genético

Os seres humanos são praticamente idênticos no nível genético, e o conjunto completo de genes e outros aspectos da seqüência do DNA são essencialmente os mesmos. Quando se compara o DNA de dois indivíduos, encontra-se uma semelhança de aproximadamente 99,5% e suas diferenças são chamadas de polimorfismo (GOLDSTEIN, 2005). Polimorfismos são definidos como variantes genéticas que estão presentes na população em uma freqüência maior que 1%, variantes de seqüência de DNA que estão presentes em uma freqüência menor que 1% na população são chamados de mutações (SCHAFER, 1998). Quando pequenas regiões do DNA apresentam polimorfismo entre indivíduos de uma mesma espécie e estes podem ser relacionadas às variações fenotípicas de características quantitativas de interesse econômico, são chamados de marcadores moleculares (HAYWARD, 1994).

Marcadores moleculares associados a estudos de genética molecular, além do melhoramento genético tradicional, são ferramentas que podem ser utilizadas para auxiliar a seleção de animais que possuem uma característica de interesse econômico, através do estudo de polimorfismos em genes que determinam tal característica. O uso de marcadores moleculares permite que o potencial genético de um animal seja determinado com maior precisão, antes mesmo da expressão do seu fenótipo. Diversas técnicas de biologia molecular estão disponíveis para detecção de variabilidade genética ao nível de seqüência de DNA, ou seja, para a

detecção de polimorfismo genético. Estas técnicas permitem a obtenção de um número ilimitado de marcadores moleculares ao longo de todo o genoma dos seres estudados. Através da utilização de enzimas de restrição, foi desenvolvida a técnica de análise de Polimorfismos do Comprimento do Fragmento de Restrição de DNA (*Restriction Fragment Length Polymorphism* – RFLP), e o desenvolvimento do processo de amplificação em cadeia utilizando a enzima DNA polimerase (Reação em Cadeia da Polimerase, ou *Polimerase Chain Restriction* – PCR) levou a descrição de outras classes de marcadores moleculares como RAPD (Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso, ou *Random Amplified Polymorphic DNA*), microssatélites e AFLP (Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados, ou *Amplified Fragment Length Polymorphism*) (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

Tem-se dado muita importância aos estudos de recursos genéticos em animais domésticos. No entanto, a população bubalina é pouco caracterizada no Brasil, apesar estes animais desempenharem um papel socioeconômico de destaque para as populações das regiões que os utilizam como fonte subsistência (ZETONE, 2013).

Entretanto, diferentemente do que acontece com os rebanhos bovinos, não ocorrem intensos programas de conservação e de melhoramento genético nacionais de bubalinos no sentido de promover uma maior produção de leite e fabricação de derivados lácteos (MALHADO, 2008). Nesta contexto, ainda são escassas as publicações que envolvem tanto marcadores químicos, quanto genéticos para bubalinos no Brasil (ZETOUNI, 2013).

Desta forma, para promover avanços no campo da genética que, visem melhoria na produção leiteira, pesquisas no ramo da biologia molecular têm possibilitado realizar a identificação e o mapeamento dos genes da leptina, responsáveis por caracterizar um melhor rebanho para produção leiteira, facilitando, a seleção baseada na caracterização genotípica desejada (REGITANO e COUTINHO, 2001).

2.6 Leptina

Durante muito tempo os cientistas buscaram um possível mensageiro (hormonal ou metabólico) que sinalizaria ao cérebro e outros tecidos o estado das

reservas energéticas do corpo. Este sinal permitiria mudanças apropriadas no consumo de alimento, no gasto de energia e na participação dos nutrientes para manter o balanço energético. A teoria de que existia um fator circulante controlando o consumo alimentar foi evidenciada nos experimentos de parabiose entre dois camundongos geneticamente obesos, nos quais os sistemas circulatórios de camundongos obesos e magros foram cirurgicamente unidos. Assim, houve troca de 1% de fluxo sanguíneo entre os camundongos. Os resultados indicaram que o aumento da massa gordurosa produziu um fator circulante, o qual, em contato com o camundongo magro, atuou induzindo a saciedade (HERVEY, 1959; COLEMAN, 1973).

Com essas descobertas, nas quais foram utilizados recursos de biotecnologia, Zang e outros (1994) identificaram e caracterizaram o gene *obese* (OB) de camundongo e o seu homônimo em humano. Em seguida, o gene da obesidade, também conhecido como gene da leptina, foi clonado em outras espécies como ratos (ZHANG, 1994) e bovinos (JI, 1998).

A leptina (do grego “leptos” que significa delgado (DIO et al., 2002)) é uma proteína de 16 kDa (quilodaltons) produto do gene “*ob*”. Possui uma cadeia polipeptídica inicial com 167 aminoácidos, dos quais os primeiros 21 aminoácidos representam uma sequência sinalizadora que é descartada antes que a proteína madura seja secretada na circulação sanguínea, sendo esta uma proteína secretada, produzida quase que exclusivamente, no tecido adiposo (ZHANG, 1994; TERMAN, 2005). Pequenas quantidades dessa proteína foram encontradas na glândula mamária (CASABIELL, 1997), no músculo esquelético (WANG, 2002), na hipófise (JIN; ZHAN; BURGUERA, 2000).

A leptina madura é monomérica com duas cisteínas formando uma ligação dissulfídica intramolecular (ZHANG, 1994). É secretada pela célula adiposa em resposta ao aumento da massa gordurosa e age no hipotálamo ventro-medial, onde diminui a biossíntese e a secreção do neuropeptídeo Y (NPY), reconhecido como mais potente modulador do apetite (DIO, 2002).

Estudos demonstram que a leptina está envolvida no controle do apetite e na modulação da secreção da insulina pelo pâncreas (SALMAN, 2007). Em uma ação autócrina, exerce um efeito inibitório sobre a captação de glicose estimulada pela insulina, reduz a lipogênese e estimula a lipólise no tecido adiposo. De maneira endócrina, estimula a captação de glicose e a síntese de glicogênio pelas células do

tecido muscular, além de acelerar a taxa de oxidação de ácidos graxos neste tecido (CEDDIA, 1999).

Este hormônio funciona como “fator de saciedade”, controlando o peso corporal por meio de um sistema feedback e mantendo a estabilidade da massa de gordura corporal. A inanição, por exemplo, leva ao decréscimo da proteína que, em resposta, cria um estado de balanço energético positivo, no qual a ingestão de alimentos excede o gasto de energia. Já o aumento na adiposidade ao um incremento nos níveis de leptina e um estado de balanço energético negativo, sendo assim, o gasto de energia excede a ingestão alimentar (FRIEDMAN, 1997). A concentração de leptina no plasma diminui rápida e profundamente como resultado da privação alimentar e balanço energético negativo (BARB, 2001).

O gene da leptina bovina é composto de três éxons e dois íntrons, correspondendo em torno de 18,9 kb (quilobase) do genoma. O primeiro e o segundo íntron têm cerca de 14 e 1,7 kb, respectivamente. A organização éxon-íntron desse gene é altamente conservada entre as espécies (SALMAN, 2007), sendo que a sequência dos ovinos é cerca de 95,6; 92,8; 88,2; 83,6 e 82% idêntica à dos bovinos, suínos, humanos, ratos e camundongos, respectivamente (KUMAR, 1998).

Alguns SNPs foram observados no gene da leptina bovina, sendo eles *LEP-2470*, *LEP-1457*, *LEP-1238* e *LEP-963*, os quais foram associados à composição do leite, dificuldade do parto, duração da gestação, taxa de mortalidade perinatal, entre outras (GILBLIN, 2010).

A leptina está envolvida com os mecanismos que regulam a ingestão e o metabolismo energético, prevenindo a deposição excessiva de gordura corporal, regulação homeostática da ingestão de alimentos, função imunológica, repartição de energia e produção de leite (LIEFERS, 2005; CHILLIARD, 2001). Age como um barômetro corporal, criando um crítico e forte elo entre homeostase energética, apetite e reprodução (FAROOQI e O'RAHILLY, 2009; BLUHER e MANTZOROS, 2007). Como as concentrações de leptina são bastante influenciadas pela massa de tecido adiposo (HOUSEKNECHT, 1998), a leptina é vista como uma molécula sinalizadora que liga o estado nutricional às funções reprodutivas (ZIEBA, 2005). Autores demonstraram que uma quantidade adequada de leptina circulante se faz necessária para atingir da puberdade (CUNNINGHAM, 1999).

Os níveis plasmáticos de leptina são afetados, principalmente, pelo nível de gordura corporal e pelo balanço energético (BLOCK, 2001). A redução das concentrações plasmáticas de leptina age como um sinal para que o cérebro conserve energia através da diminuição de funções reprodutivas e imunológicas, pois as mesmas não são essenciais para sobrevivência a curto prazo (HOUSEKNECHT, 1998), fazendo com que o organismo utilize a energia disponível em funções essenciais para a sobrevivência.

Alguns autores demonstraram que uma das principais funções da leptina é a de ajudar os animais a adaptarem-se a períodos de subnutrição, pois essa proteína é a principal reguladora do armazenamento, equilíbrio e uso da energia disponível pelo organismo (CEDDIA *et al.*, 1998; CHILLIARD *et al* 2005).

Entre os anos de 1994 a 2001, significativos progressos foram feitos sobre a fisiologia da leptina em humanos e em roedores, porém o progresso foi mais lento em ruminantes, devido a dificuldades encontradas no desenvolvimento de ferramentas específicas para estudar a expressão gênica e as variações plasmáticas encontradas nesses animais (INGVARTSEN e BOISCLAIR, 2001). O gene *LEP*, localizado no cromossomo autossômico 4 de *Bos taurus*, é o responsável pela codificação da leptina (LAGONIGRO, 2003). Como esse hormônio está envolvido com o consumo alimentar, particionamento de energia e com o metabolismo das vacas, a leptina pode, conseqüentemente, afetar características como produção de leite (LIEFERS, 2002), balanço energético (BUCHANAN, 2003) e reprodução (SILVA, 2002). Mutações nos genes que codificam a leptina ou em seus receptores são responsáveis por obesidade, infertilidade e resistência à insulina em roedores e humanos (HOUSEKNECHT e PORTOCARRERO, 1998). O estudo da leptina e a associação de seus polimorfismos a características importantes para a produção, como uma melhor qualidade de carne e leite, têm sido de grande importância para programas de melhoramento genético (ZETOUNI, 2013).

Em gado leiteiro, os diferentes polimorfismos encontrados foram associados a inúmeras características de interesse econômico, como balanço energético, produção de leite, peso vivo e fertilidade (LIEFERS, 2002), consumo de matéria seca (BANOS, 2008), consumo de ração (NKRUMAH, 2005; LAGONIGRO, 2003; LIEFERS, 2002) e concentrações séricas de leptina (LIEFERS, 2003). CHEBEL (2008) constataram, uma associação entre SNPs localizados na região codificadora do gene da leptina com saúde e lactação de vacas leiteiras. VAN DER LENDE

(2005) descobriram diferentes SNPs associados a características como produção e composição do leite e concentrações de leptina circulante no período final da gestação. Além disso, variações na concentração de leptina durante a gestação, são afetadas por polimorfismos encontrados no gene *LEPR* (receptor da leptina) (LIEFERS, 2004), localizado no cromossomo 3, sugerindo possíveis associações desse último com características produtivas ligadas a leptina.

Em suínos, ROBERT (1998) observaram que os polimorfismos no gene da leptina estavam associados com animais magros. Por sua vez HARDGE (1998) observaram correlação estatisticamente significativa entre o polimorfismo detectado por RFLP com a enzima de restrição *Hinfl* no gene da leptina com a relação carne/gordura e com a espessura de gordura em uma população de 560 suínos.

O SNP *LEP-1620 (A/G)* (GenBank y11369), localizado na posição 70 do íntron 2 do gene da leptina (LIEN,1997), foi relacionado positivamente ao peso à desmame em bovinos da raça Nelore (SOUZA, 2010), Porém, estudos que relacionam esse polimorfismo com características de produção leiteira em bubalinos não foram encontradas na literatura.

Por ser um gene que é amplamente associado a características de interesse para a produção, faz-se necessário o seu estudo do gene da leptina na espécie bubalina, a fim de encontrar possíveis associações entre polimorfismos e características produtivas como um auxílio para o melhoramento genético dessa espécie.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar a existência do polimorfismo *LEP 1620 (A/G)* no gene que codifica o hormônio da leptina em búfalas e suas possíveis associações com a produção leiteira na região nordeste do Brasil (Pernambuco e Alagoas)

2.2 Objetivos específicos

- Determinar o polimorfismo *LEP 1620 (A/G)* na posição 70 do íntron 2, do gene da leptina;
- Estimar a frequência dos polimorfismos na população em estudo;
- Correlacionar o polimorfismo no gene *da leptina* com a produção leiteira das búfalas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALASUBRAMANIAN, S.P; COX, A., BROWN, N.J.; Reed, M.W.; (2004). Candidate gene polymorphism in solid cancers. *Eur J Surg Oncol* , v. 6.
- BANOS, G.; WOOLLIAMS, J. A.; WOODWARD, B. W.; FORBES, A. B.; COFFEY, M. P. (2008) Impact of single nucleotide polymorphisms in leptin, leptin receptor, growth hormone receptor, and diacylglycerol acyltransferase (DGAT1) gene loci on milk production, feed, and body energy traits of UK dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 91.
- BARB, C.R.; HUASMAN, G.J.; HOUSEKNECHT, K.L. (2001) Biology of leptin in the pig. *Domestic Animal Endocrinology*, Athens, v. 21.
- BASTAINETTO, E.; (2009) Criação de búfalos no Brasil: situação e perspectiva *Rev Bras Reprod Anim Supl*, Belo Horizonte, n. 6, p. 98-103.
- BENEVIDES, C.M.J. (1998) Leite de búfalas-Qualidades tecnológicas *Rev Higiene alimentar*. n. 54.
- BLUHER, S.; MANTZOROS, C. S. (2007) Leptin in reproduction. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*, v. 14.
- BUCHANAN, F. C.; FITZSIMMONS, C. J.; VAN KESSEL, A. G.; THUE, T. D.; WINKELMAN-SIM, D. C.; SCHMUTZ, S. M (2002). Association of a missense mutation in the bovine leptin gene with carcass fat content and leptin mRNA levels. *Genetics Selection Evolution*, v. 34.
- CARROLL, R. L. (1988) *Vertebrate Paleontology and Evolution*. W. H. Freeman and Company, New York.
- CASABIELL, X. (1997). Presence of leptin in colostrum and/or breast milk from lactating mothers: a potential role in the regulation of neonatal food intake. *Journal of Clinical and Endocrinology Metabolism*, Charlotte, n. 82, v. 12.

CASAS, E.; WHITE, S. N.; WHEELER, T. L.; SHACKELFORD, S. D.; KOOHMARAIE, M.; RILEY, D. G.; CHASE, C. C., JOHNSON, D. D.; SMITH, T. P. L., (2006) Effects of calpastatin and *l*-calpain markers in beef cattle on tenderness traits. *Journal of Animal Science*, v. 84.

CEDDIA, R.B.; WILLIIAN JR, W. N.; LIMA, F. B.; CARPIMELLI, A. R.; CURI, R. (1999) Modulation of insulin secretion by leptin. *General Pharmacology, Berkeley*, v. 32.

CEDDIA, R. P.; WILLIIAN JR, W. N.; LIMA, F. B.; CARPIMELLI, A. R.; CURI, R. (1998) Pivotal role of leptin in insulin effects. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 31, p. 715-722.

CHILLIARD, Y.; DELAVAUD, C.; BONNET, M. (2001) Leptin in ruminants. Gene expression in adipose tissue and mammary gland, and regulation of plasma concentration. *Domestic Animal Endocrinology*. v. 21, 03–22.

CHILLIARD, Y.; DELAVAUD, C.; BONNET, M., (2005) Leptin expression in ruminants: Nutritional and physiological regulations in relation with energy metabolism. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 29.

COCKRILL, W. R. (1984) Water buffalo. In: I. L. Mason (Editor), *Evolution of Domesticated Animals*. New York: Longman Inc. p. 52-53.

COLEMAN, D.L. (1973) Effects of parabiosis of obese white diabetes and normal mice. *Diabetologia, Bristol*, v. 9.

DAMASCENA, A. (2010) Adaptação de bubalinos ao ambiente tropical, v. 07, p.1370-1381.

FRANCISCIS, G.D., PALO, R.D. (1994) Buffalo milk production. In: *World Buffalo Congress*, v. 4, São Paulo.

DENDER, A.G.F. (1988) Uso de creme de leite de búfala e de vaca na fabricação do Queijo tipo “pascarpone”. Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes, Minas Gerais.

DIO, R.D. (2002) Leptina: fisiologia dos mecanismos mantenedores do peso “versus” fisiopatologia da obesidade – Informativo CRIESP, São Paulo.

FAO. (1991) Food and Agriculture Organization. O búfalo. Brasília: Ministério da Agricultura; Associação Brasileira dos Criadores de Búfalos São Paulo.

FAO. Food Agriculture Organization, (2014). Disponível em: < <http://faostat.fao.org>>. Acesso em 11 de novembro de 2014.

FAROOQI, I. S.; O’RAHILLY, S. (2009) Leptin: a pivotal regulator of human energy homeostasis. American Journal of Clinical Nutrition, v. 89.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA D. (1998). Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, 3a edição.

FRIEDMAN, J.M. (1997) The alphabet of weight control. Nature, Seattle, v.385, p.119-120.

FURTADO, M.M. (1990) Leite de búfala: características e fabricação de queijos. S EPAMIG - Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais. Inst. de laticínios Cândido Toste. Juiz de Fora- M.G.

GOLDSTEIN, D.B.; CAVALLERI G. L. (2005) Understanding human diversity. Nature, v. 437, p.1241-1242.

HAMANN, A.; MATTHAEI, S. (1996) Regulation of energy balance by leptin. Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes, v. 104.

HARDJE, T.; KÖPKE, K.; WIMMERS, K.; LEUTHOLD, D. (1998) Association between polymorphism of the leptin gene (*lep*) and performance traits in a porcine resource family and in commercial outbred population *Animal Genetics*, v. 29, n.1.

HAYWARD, M.D.; MCADAM, N.J.; JONES, J.G. et al. (1994) Genetic markers and the selection of quantitative traits in forage grasses. *Euphytica*, v. 77, p. 269-275.

HOU, G. (2010) Associated analysis of single nucleotide polymorphisms of IGF2 gene's exon 8 with growth traits in Wuzhishan pig. *Molecular Biology Reports*, v. 37.

HOUSEKNECHT, K. L.; PORTOCARRERO, C. P. (1998) Leptin and its receptors: regulators of wholebody energy homeostasis. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 15.

HÜHN, S. (1986) Aproveitamento do leite de búfala em produtos derivados. In: SIMPÓSIO DO TRÓPICO ÚMIDO, v. 5, Belém.

Associação Brasileira de criadores de búfalos acesso Disponível em <<http://www.bufalo.com.br/murrah.html#2>> Acesso em 26 de dezembro de 2014.

INGVARTSEN, K. L.; BOISCLAIR, Y. R. (2001). Leptin and the regulation of food intake, energy homeostasis and immunity with special focus on periparturient ruminants. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 21.

IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, (2010). Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/default.php>>. Acesso em 12 de novembro de 2014.

JI, S. et al. (1998) Partial cloning and expression of bovine leptin gene. *Animal Biotechnology*, West Lafayette, v.9, p.1-14.

KATHIRAVAN, P.; KATARIA, R. S.; MISHRA, B. P.; DUBEY, P. K.; SELVAKUMAR, M.; TYAGI, N. (2009) Seven novel single nucleotide polymorphisms identified within river buffalo (*Bubalus bubalis*) lactoferrin gene. *Tropical Animal Health Production*, v. 42, p. 1021-1026.

KIJAS, J. W. (2009) International Sheep Genomics Consortium. A genome wide survey of SNP variation reveals the genetic structure of sheep breeds. PLoS One, v. 4.

KUMAR, S.; NAGARAJAN, M.; SANDHU, J. S.; KUMAR, N.; BEHL, V.; NISHANTH, G (2007) Mitochondrial DNA analyses of Indian water buffalo support a distinct genetic origin of river and swamp buffalo. Animal Genetics, v. 38.

KUMAR, S. NAGARAJAN, M.; SANDHU, J. S.; KUMAR, N.; BEHL, V.; NISHANTH, G. (2007) Mitochondrial DNA analyses of Indian water buffalo support a distinct genetic origin of river and swamp buffalo. Animal Genetics, v. 38.

LAGONIGRO, R.; WIENER, P.; PILLA, F.; WOOLLIAMS, J.A.; WILLIAMS, J. L, (2003) Short Communication: A new mutation in the coding region of the bovine leptin gene associated with feed intake. Animal Genetics, v. 34.

LIEFERS, S.C.; TE PAS, M.F.W.; VEERKAMP, R.F.; CHILLIARD, Y.; DELAVAUD, C.; GERRITSEN,R.; VAN DER LENDE, T. (2003) Association of leptin gene polymorphisms with serum leptin concentration in dairy cows. Mammalian Genome, v. 14.

LAGONIGRO, R.; WIENER, P.; PILLA, F.; WOOLLIAMS, J. A.; WILLIAMS, J. L. (2003) Short Communication: A new mutation in the coding region of the bovine leptin gene associated with feed intake. Animal Genetics, v. 34, p. 371–374.

LARA, M.A.C. (1998) Variabilidade genética em bovinos e bubalinos através de polimorfismos protéicos: análise populacional e suas implicações no melhoramento. Tese (Doutorado em Genética) -. Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, SP.

LIEFERS, S.C. TEPAS, M.F.W.; VEERKAMP, R.F.; CHILLIARD, Y.; DELAVAUD, C.; GERRITSEN, R.; VAN DER LENDE, T. (2003) Association of leptin gene

polymorphisms with serum leptin concentration in dairy cows. *Mammalian Genome*, v. 14. p. 657-663.

LIEFERS, S.C.; TE PAS, M.F.W.; VEERKAMP, R.F.; VAN DER LENDE, T. (2002). Association between leptin gene polymorphisms and production, live weight, energy balance, feed intake and fertility in Holstein heifers. *Journal of Dairy Science*, v. 85. p. 1633–1638

LIEFERS, S.C.; VEERKAMP, R.F.; TE PAS, M. F. W.; DELAVAUD, C.; CHILLIARD, Y.; VAN DERLENDE, T. (2004). A missense mutation in the bovine leptin receptor gene is associated with leptin concentrations during late pregnancy. *Animal Genetics*, v. 35, p. 138–141.

LOURENÇO, J.B.; NETO, N.M.; AS, T.D.A.; CAMARÃO, A.P.; LOURENÇO A.V.; MORAES, M.P.S.; SILVA, J.A.R. Carcass characteristics and composition of cattle and water buffaloes raised on cultivated pasture ecosystem Marajo island, Brasil. *Buffalo Journal* (2000).

MALHADO, C.H.; RAMOS, A.A.; CARNEIRO, P.L.S. (2008) Melhoramento e estrutura populacional em bubalinos da raça Mediterrâneo no Brasil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.43.

MARQUES, J.R.F. (2000). Búfalos: produtor pergunta a Embrapa responde. Embrapa Amazônia Oriental (Belém, PA) – Brasília: Embrapa Comunicação para transferência de tecnologia.

NADER FILHO, A., (1984) Estudo da variação do ponto crioscópico do leite de búfala. *Rev.do Inst. Cândido Toste, Juiz de Fora-Mg. Ganguli NC*.

MANO FILHO, A.C. (1985) Raças de Búfalos. IN: semana de Zootecnia 10, Pirassununga. Fundação Cargil, Campinas.

NASCIMENTO, C.; CARVALHO, L.O.M. (1993) Criação de búfalos: alimentação, manejo, melhoramento e instalações. Brasília, Distrito Federal

NASCIMENTO, C.; CARVALHO, L.O.M. (1993) Criação de Búfalos-Alimentação, manejo, melhoramento e instalações. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e Reforma Agrária. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA. Brasília, D.F.

NKRUMAH, J. D.; LI, C.; YU, J.; HANSEN, C.; KEISLER, D.H.; MOORE, S.S. (2005) Polymorphisms in the bovine leptin promoter associated with serum leptin concentration, growth, feed intake, feeding behavior, and measures of carcass merit. *Journal of Animal Science*, v. 83.

ROBERT, C.; PALIN, M.; COULOMBE, N.; ROBERGE, C.; SILVERSIDES, F. G.; BENKEL, B. F.; MCRAY, R. M; PELLETIER, G. (1998) Backfat thickness in pigs is positively associated with leptin mRNA levels. *Canadian Journal of Animal Science*, v. 78.

RUSSO, H.G. (1986) Bubalinocultura Gov. do Estado de S.Paulo. Secretaria de Agricultura e Abastecimento. Campinas, S.P.

SALMAN, A.K.D.; BERMAL, R.C.; GIACHETTO, F.P. (2007) Gene da leptina em ruminantes. *REDVET -Revista electrónica de Veterinaria*, v. 8.

SCHAFER, A; HAWKINS J.R. (1998) DNA variation and the future of human genetics. *Nature Biotechnology*, v. 16, p.33-39

SILVA, L.F.P.; VANDEHAAR, M.J.; NIELSEN, M.S.W.; SMITH, G.W. (2002). Evidence for a local effect of leptin in bovine mammary gland. *Journal of Dairy Science*, v. 85.

SOUSA, C.L.; NEVES, E.C.A.; CARNEIRO, C.A.A. (2002). Avaliação microbiológica e físico-química de doce de leite e requeijão produzidos com leite de búfala na Ilha de Mrajó-PA. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, Curitiba, v.20.

TERMAN, A. (2005) Effect of the polymorphisms of prolactin receptor (PRLR) and leptin (LEP) genes on litter size in Polish pigs. *Journal of Animal Breeding and Genetic*, Oxford, v.122.

TONHATI, H., GIANNONI, M.A., POLASTRE, R. (1988), Repe-tibilidade e fatores ambientais que afetam algumas características produtivas nos bubalinos, In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 25, Viçosa. *Anais...* Viçosa: SBZ, 1988b. p.265.

VAN DER LENDE, T. et al.(2005)Leptin gene polymorphisms and their phenotypic associations. *Vitamines & Hormones*, v. 71.

VERRUMA-BERNARDI, M.R. (2006) Perfil sensorial e preferência do iogurte de leite de búfala. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos*, v.24.

VERRUMA M.R, SALGADO J.M. Análise química do leite de búfala em comparação do leite de vaca. *Science Agriculture*, v.51.

YABU, M.C., (1988). Características físico químicas e sensoriais de iogurte produzido de mistura de leite bovino e bubalino. *Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes*, Juiz de Fora - M.G.

ZHANG, Y.; PROENCA, R.; MAFFEI, M. et al. (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*.

ZIEBA, D. A.; AMSTALDEN, M.; WILLIAMS, G. L. (2005). Regulatory roles of leptin in reproduction and metabolism: A comparative review. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 29.

WANG, Y.; MONTEIRO, C.; POPKIN, B.M. (2002) Trends of obesity and underweight in older children and adolescents in the United States, Brazil, China, and Russia. *American Journal of Clinical Nutrition*, Houston, v.75.

ARTIGO Submetido à revista Ciência Rural

1

2

3 Análise do polimorfismo no gene da leptina em búfalas da raça murreh nos estados de
4 Pernambuco e Alagoas e na relação com a produção leiteira.

5 Analysis of polymorphism in gene in leptin murreh buffaloes in member of Pernambuco and
6 Alagoas and relationship with milk production.

7 Autores: Luciana Costa, Manoel Adrião Gosmes Filho, Ericka Queiroz, Maria de Mascena
8 Diniz Maia, Jamilly Lopes, Nadia Martinez e Alina Mitat

9 **RESUMO** – O polimorfismo genético *LEP 1620* (A/G), localizado no íntron 2 do gene da
10 leptina, tem sido associado com características como percentagem de gordura e de proteína e
11 outras características de produção de leite em bovinos. Contudo, estudos que relacionem este
12 polimorfismo com características da produção em bubalinos são poucos. Sendo assim,
13 objetivou-se no presente estudo, identificar a presença do polimorfismo *LEP 1620* (A/G) no
14 gene que codifica o hormônio da leptina em búfalas e suas possíveis associações com a
15 produção leiteira na região Nordeste do Brasil. Foram coletas amostras de sangue de 139
16 búfalas da raça murreh nos estados de Pernambuco e Alagoas. de duas fazendas nos estados
17 de Pernambuco e Alagoas , e após a extração de DNA essas amostras foram genotipadas pela
18 técnica PCR-RFLP, como resultado disto foram encontrados os genótipos AA, AG, GG.
19 Sendo que o genótipo AG associado a uma maior produção de leite para a fazenda do Estado
20 Alagoas ($p < 0,05$), quando comparada com a fazenda do estado de Pernambuco. Porém, os
21 genótipos apresentados neste estudo, não foram associados às variáveis analisadas para dias
22 de lactação e produção média diária.

23 **Palavras chaves** – bubalino, gene da leptina, leite, polimorfismo.

1 **ABSTRACT-** The genetic polymorphism LEP 1620 (A / G) located in intron 2 of the leptin
2 gene has been strongly associated with characteristics such as percentage of fat and protein
3 and other milk yield characteristics in cattle. However, studies that relate this polymorphism
4 with production traits in buffalo are few reported. Thus, the aim of this study was to identify
5 the presence of LEP 1620 polymorphism (A / G) in the gene encoding the hormone leptin in
6 buffaloes and their possible association with milk production in Northeastern Brazil. Blood
7 samples were collected from 139 buffaloes breed murreh from two farms in the Pernambuco
8 and Alagoas . After DNA extraction the samples were genotyped by PCR-RFLP technique.
9 The AA, AG, GG genotypes were found. However, the AG genotype was associated with a
10 higher milk production for the farm A, compared to farm F. **Key words** – buffalo, leptin
11 gene, polymorphism, milk.

12 **INTRODUÇÃO**

13 A população de búfalos no mundo está estimada em 200 milhões de animais. Com
14 relação ao Brasil, este possui o maior rebanho de búfalos da América com aproximadamente
15 1.277.200 cabeças (LAZZARI,2010; FAO,2014). A maior representatividade desse rebanho
16 encontra-se nas regiões Norte e Nordeste do País, nos estados do Pará (38%), Amapá (18,4%)
17 e no Maranhão (6,5%). Dados de 2010 e 2011 mostram um aumento de 7,8% na população de
18 bubalina (IBGE, 2011).

19 O setor mais importante da bubalinocultura é, sem dúvida, a de leite, que varia
20 segundo o país e região; no Brasil a produção aumentou de $725,45 \pm 228,81$ kg (TONHATI et
21 al., 1988) para 1.638 ± 652 kg (HURTADO-LUGO et al., 2011). Além disso, os bubalinos
22 apresentam produtividade leiteira economicamente superior aos zebuínos, sendo, cada litro de
23 leite é produzido a menor custo. Além disso, os búfalos apresentam rusticidade extraordinária,

1 melhor aproveitamento de forragem com qualidade inferior, grande resistência a doenças e às
2 mais adversas condições climáticas. (BENEVIDES, 1998).

3 Para um bom aproveitamento e seleção de um rebanho que forneça um leite de melhor
4 qualidade, estudos em bovinos, procuram relacionar polimorfismos genéticos com a qualidade
5 de produção do leite. Porém, poucos trabalhos desse tipo são feitos com búfalos (ZETOUNI,
6 2013). Marcadores moleculares associados ao estudo da genética molecular, além do
7 melhoramento genético tradicional, são ferramentas que podem ser utilizadas para auxiliar a
8 seleção de animais que possuem uma característica de interesse econômico, através do estudo
9 de polimorfismos em genes que determinam tal característica. Neste sentido, pesquisas foram
10 desenvolvidas com o intuito de identificar marcadores moleculares associados a componentes
11 do leite em búfalas (REN et al., 2009; COSENZA et al., 2009), bem como associados a
12 produção de leite em bovinos e bubalinos (LARA, 2011; ZETOUNI et al., 2013).

13 A leptina (do grego “leptos” que significa delgado (DIO et al., 2002) é uma proteína
14 de 16 kDa (quilodaltons) produto do gene *ob*, possui uma cadeia polipeptídica inicial com 167
15 aminoácidos, dos quais os primeiros 21 aminoácidos representam uma sequência sinalizadora
16 que é descartada antes que a proteína madura seja liberada na circulação sanguínea, sendo esta
17 uma proteína secretada e produzida, quase que exclusivamente, no tecido adiposo (ZHANG
18 ,1994; TERMAN, 2005). Está envolvida com os mecanismos que regulam a ingestão e o
19 metabolismo energético, prevenindo a deposição de gordura corporal, regulação homeostática
20 da ingestão de alimentos, função imunológica, repartição de energia e produção de leite
21 (LIEFERS et al., 2005; CHILLIARD et al., 2001).

22 O polimorfismo genético *LEP 1620* (A/G), localizado na posição 70 do intron 2 do
23 gene da leptina, foi positivamente associado à porcentagem de gordura e proteína do leite de
24 búfalas (ZETOUNI et al., 2012) e com peso ao desmame em bovinos da raça Nelore (SOUZA

1 et al., 2009). No entanto, estudos que relacionem o este polimorfismo com características de
2 produção em bubalinos são bastante escassos na literatura.

3 Assim, o objetivo do presente estudo foi identificar o polimorfismo *LEP 1620 (A/G)*
4 no gene que codifica o hormônio da leptina em búfalas e suas possíveis correlação com a
5 produção leiteira em duas cidades na região nordeste do Brasil.

6 **MATERIAL E MÉTODOS**

7 **Animais**

8 Foram utilizadas 139 búfalas da raça Murrah, clinicamente sadias, criadas de maneira
9 semi-intensiva, pertencentes a duas fazendas na região nordeste do Brasil, uma no estado de
10 Pernambuco, e a outra no estado de Alagoas.

11 **Coleta do Material Biológico e processamento das amostras**

12 Foram coletados 5 ml de sangue total (tubos para coleta de sangue a vácuo) de búfalas,
13 pela veia coccígea dos 139 animais . As amostras de sangue foram acondicionadas em isopor
14 e encaminhadas ao Laboratório de Fisiologia Animal Molecular Aplicada (FAMA) do
15 Departamento de Morfologia e fisiologia animal (DMFA) da Universidade Federal Rural de
16 Pernambuco (UFRPE)

17 **Extração de DNA e genotipagem das amostras**

18 A extração do DNA do sangue total foi realizada através do método Fenol clorofórmio
19 modificado por Maniatis et al., (1989).

20 As amostras de DNA extraídas foram submetidas à técnica de PCR para amplificação
21 da região localizada na posição 70 do intron 2. As sequências dos *primers* utilizados foram:
22 (LEP 1) 5'- GTC TGG AGG CAA AGG GCA GAG T -3' e (LEP 2) 5'- CCA CCA CCT
23 CTG TGG AGT AG -3', descritas por LIEN *et al.* (1997).

1 As soluções *mix* para a PCR (MultiGene – Labnet®) foram preparadas com um
2 volume final de 20 µL, contendo 3 µL de DNA (100 ng), 1 µL de cada *primer* (15 pM), 5 µL
3 de água qsp e 10 µL de Go Taq® Green Master Mix (Promega).

4 Para a amplificação da região de interesse, foi utilizado a seguinte ciclagem: 94°C por
5 5 minutos; 94°C por 15 segundos, 58°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto (35 ciclos);
6 seguido de extensão final a 72°C por 4 minutos. Após o ciclo de amplificações, as amostras
7 ficaram armazenadas a 4°C.

8 Para a realização da PCR-RFLP, utilizou-se uma mistura contendo 10 µL do produto
9 de PCR, 0,5 µL da enzima de restrição BsaAI, 0,5 µL do tampão da enzima 10X e 8,0 µL de
10 água, em um volume final de 19 µL. As amostras foram submetidas a 37°C por 3 horas, para a
11 digestão do fragmento. Em seguida, foram coradas com Blue Green Loading Dye (LGC
12 biotecnologia) e submetidas a eletroforese em gel de agarose (3%), por aproximadamente 90
13 minutos, a 110 V.

14 Os produtos da digestão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (3 %) e
15 visualizados em luz ultravioleta, onde foi possível identificar três genótipos diferentes: AA
16 (522pb), AG (522, 441 e 81pb) e GG (441 e 81pb).

17 **Descrição das variáveis do estudo**

18 No presente estudo foram analisados os dados de produção leiteira de búfalas de duas
19 fazendas na região nordeste do Brasil, Pernambuco e Alagoas, tais como: produção Leiteira,
20 na qual foi considerada a última lactação dos animais entre os períodos de junho de 2013 a
21 junho de 2014, dias de lactação (quantos dias as búfalas passaram produzindo leite, na
22 referida lactação) e média diária de lactação (calculada dividindo a produção leiteira pelos
23 dias em que os animais passaram em lactação). Outras variáveis também foram observadas
24 durante o estudo como pico da produção, número de lactações, peso ao nascer e peso ao

1 desmame dos animais. Os dados foram retirados do Programa Prodap Profissional GP,
2 cedidos pelos proprietários das fazendas.

3 **Análises estatísticas**

4 As análises foram realizadas no software SPSS (Statistical Package for the Social Science),
5 versão 21. Adotou-se margem de erro 5% para significância ($p < 0,05$). Os resultados foram
6 expressos em percentuais, médias e desvio-padrão. Empregou-se teste de normalidade de
7 Kolmogorov-Smirnov, para analisar se a distribuição era paramétrica e não paramétrica.
8 Testes de comparação e análise de variância também foram feitos.

9 **RESULTADOS DE DISCUSSÃO**

10 O gene da leptina foi amplificado em todas as 139 amostras, obtendo-se fragmentos de
11 522pb.

12 As análises das frequências genotípicas para o polimorfismo *LEP 1620* do gene da
13 leptina dos animais das fazendas de Pernambuco e Alagoas, assim como, dos animais
14 formando um único grupo (Grupo total) é mostrada na tabela 1, onde se observou um maior
15 percentual do genótipo AG nas duas situações (53,8% na fazenda do estado de Pernambuco,
16 45,2 na fazenda do estado de Alagoas e 50,4% no grupo total). Esses dados corroboram com
17 os encontrados por AZARI *et al* (2012) nas três populações por eles estudadas para o
18 polimorfismo no gene *LEP 1620* da Leptina em vacas da raça Holandesa, bovino nativo
19 (Mazandarani) e búfalos, onde foi obtido, a maior frequência para o genótipo heterozigoto
20 AG. Dados também encontrados por Zetouni *et al* (2013) para uma população de búfalas de
21 Jabuticabal/ São Paulo. Entretanto, no presente estudo, não se comprova diferença
22 significativa entre as fazendas em relação à distribuição genotípica ($p > 0,05$).

23 Quando foram analisadas as possíveis associações existentes entre os genótipos e as
24 variáveis do estudo (produção leiteira, dias de lactação e produção média diária), por

1 genótipo, independente da fazenda, verificou-se que as médias de produção leiteira e dias de
2 lactação foram mais elevadas entre os animais que apresentavam o genótipo GG e menos
3 elevadas nos que apresentavam genótipo AG. Contudo esta diferença não foi estatisticamente
4 significativa ($p=0,093$) (Tabela 2). Estes dados não estão de acordo com os dados
5 encontrados por ZETOUNI *et al.* (2013), que estudando o mesmo polimorfismo em búfalas,
6 observou que o genótipo AA apresentou uma maior média de produção de leite. Ao analisar a
7 variável produção média diária, observou-se que os animais com genótipo AA tiveram a
8 maior média (média= 5,62). Entretanto, não houve diferença significativa entre os genótipos
9 para as três variáveis ($p > 0,05$), conforme os resultados apresentados (Tabela 2). Estas
10 diferenças entre os estudos podem ser justificadas por diferentes razões, como, por exemplo,
11 as diferentes frequências dos genótipos entre as populações estudadas, ou mesmo devido à
12 interação entre genótipo e ambiente.

13 A comparação entre as fazendas por tipo de genótipo para as variáveis, produção
14 leiteira e dias de lactação (tabela 3), demonstrou que as media de produção leiteira foram mais
15 elevadas nos animais da fazenda Alagoas (médias para os genótipos AA, GA, GG
16 respectivamente 2.090,80; 2.229,25; 2.218,56), do que na Pernambuco (médias para os
17 genótipos AA, GA, GG respectivamente 1.624,57; 1.434,28; 1.734,90) para cada um dos
18 genótipos estudados, enquanto que na variável dias de lactação, quase todas as médias foram
19 mais elevadas na fazenda Pernambuco (médias para os genótipos AA, GA, GG foram
20 respectivamente 294,71; 276,27; 309,59) do que na Alagoas (médias para os genótipos AA,
21 GA, GG foram respectivamente 266,90; 277,30; 293,44). Entretanto, a única diferença
22 significativa ($p < 0,05$) ocorreu na variável produção leiteira, através do teste de comparações
23 múltiplas para os genótipos AG ($p=0,001$) e GG ($p=0,017$).

1 Mesmo a fazenda do estado de Pernambuco possuindo animais com médias de dias de
2 lactação um pouco mais elevadas do que a fazenda Alagoas, esta última possui uma maior
3 produção leiteira. Isso pode ser justificado pela forma com a qual é feito o manejo dos
4 animais nas fazendas.

5 De acordo com PETERS et al (2008), ocorre influência do manejo em relação à
6 produção do leite. Eles concluíram que o estresse no manejo aversivo provoca a diminuição
7 da produção e para atender às necessidades do bem estar animal é necessário que o manejo do
8 produtor seja de ótima qualidade. Por isso, a aquisição de conhecimentos por parte dos
9 produtores/tratadores, adoção de novas tecnologias, melhoria na qualidade do manejo,
10 priorizando o bem estar animal garantem a qualidade na produção (JACINTO, 2011;
11 COUTO, 2012).

12 As fazendas dos estados de Pernambuco e Alagoas apresentaram dados em comum,
13 entretanto a fazenda de Pernambuco, apresentou outras variáveis, como pico de produção,
14 peso ao nascer e peso ao desmame. Nesse caso, não encontramos diferenças significativas
15 entre essas variáveis e os genótipos estudados . SOUZA *et al*, 2009 estudando bovinos da raça
16 Nelore, encontraram associação entre o SNP *LEP 1620* (A/G) com o peso ao nascer. As
17 diferenças encontradas entre os estudos podem ser justificada pela diferença entre as espécies.

18 **CONCLUSÃO**

19 Diante do exposto, concluiu-se que búfalos da raça Murrah apresentam polimorfismo da
20 leptina, com predominância do genótipo AG, porém sem relações significativas com as
21 variáveis de produção estudadas. Nesse estudo pode-se observar também, que o polimorfismo
22 da leptina, somente os genótipos AG e GG determinam maior produção de leite, quando
23 associados a boas práticas de manejo em detrimento de estabelecimento sem essa condição. Isto

1 provavelmente se deve a adoção de novas tecnologias, melhoria na qualidade do manejo,
2 priorizando o bem estar animal o que pode garantir uma melhor produção leiteira das búfalas.

3 **AGRADECIMENTOS**

4 À CAPES pela concessão da bolsa de pesquisa e ao convênio MES/CUBA 128/ 11
5 pelo apoio financeiro para realização da pesquisa. E aos Srs Alberto Couto e Paulo Correia
6 por terem cedido o material de estudo da presente pesquisa.

7 **FONTES DE AQUISIÇÃO**

8 Este estudo foi financiado pelo convênio MES/CUBA (nº 128-11)/CAPES.

9 **INFORME VERBAL**

10 Os conceitos e afirmações contidos neste artigo são de inteira responsabilidade dos
11 seus autores.

12 **COMITÊ DE ÉTICA**

13 Este estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais –
14 CEUA (nº 123/2014) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). O mesmo
15 também se encontra de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei
16 11794/2008.

17 **REFERÊNCIAS**

18 BENEVIDES C.M.J Leite de búfalas-Qualidades tecnológicas Rev Higiene alimentar n 54,
19 1998. Acesso em:< <http://www.bichoonline.com.br/artigos/ha0015.htm>>
20 BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 25, 1988, Viçosa, MG. **Anais...** Viçosa: SBZ, 1988. p. 265.
21 HURTADO-LUGO, N. A. et al. Buffalo milk production in Brazil and Colombia: Genotype
22 by environment interaction. **Livestock Research for Rural Development**, v. 23, p. 1-4,
23 2011. Disponível em: < <http://www.lrrd.cipav.org.co/lrrd23/7/hurt23146.htm>>. Acesso em: 01
24 nov. 2014.

- 1 CHILLIARD, Y. et al. Leptin in ruminants. Gene expression in adipose tissue and mammary
2 gland, and regulation of plasma concentration. **Domestic Animal Endocrinology**. v. 21,
3 2001. Disponível em: <[http://www.domesticanimalendo.com/article/S0739-7240\(01\)00124-](http://www.domesticanimalendo.com/article/S0739-7240(01)00124-2/pdf)
4 [2/pdf](http://www.domesticanimalendo.com/article/S0739-7240(01)00124-2/pdf)> Acesso em: 29 dez. 2014. Doi: 10.1016/S0739-7240(01)00124-2.
- 5 COSENZA, G. et al. A point mutation in the splice donor site of intron 7 in the alphas2-casein
6 encoding gene of the Mediterranean River buffalo results in an allele-specific exon skipping.
7 **Animal Genetics**, v. 40, n. 5, p. 791, 2009. Disponível em:
8 <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19422363>> Acesso em: 20 de nov. 2014 doi:
9 10.1111/j.1365-2052.2009.01897.
- 10 FAO. **Food Agriculture Organization**, United Nations, 2009. Acesso em: 11 nov. 2014.
11 Online. Disponível em: <<http://faostat.fao.org>>.
- 12 GIBLIN, L.; et al. Association of bovine leptin polymorphisms with energy output and energy
13 storage traits in progeny tested Holstein-Friesian dairy cattle sires. **BMC Genetics**, v. 11, p.
14 73, 2010. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2156/11/73>> Acesso em: 29
15 dez. 2014 doi:10.1186/1471-2156-11-73.
- 16 IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**, 2010. Acesso em: 12 nov. 2014.
17 Online. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/default.php>>.
- 18 JACINTO, D. M. R. **Bem-estar animal em explorações leiteiras: percepção dos**
19 **produtores vs realidade**. 2011. 116f. Tese (Doutorado). Curso de Mestrado Integrado em
20 Medicina Veterinária, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa.
- 21 LARA, M. A C. **Variabilidade genética em bovinos e bubalinos através de polimorfismos**
22 **protéicos: análise populacional e suas implicações no melhoramento**. 1998. Tese
23 (Doutorado em Genética) -. Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão
24 Preto.

- 1 LIEFERS, S. C. et al. Genetics and physiology of leptin in periparturient dairy cows.
2 **Domestic Animal Endocrinology**, v. 29, p. 227–238, 2005. Disponível em:
3 <<http://dx.doi.org/10.4236/ojas.2012.23024>>. Acesso em: 09 out. 2014. Doi:
4 10.4236/ojas.2012.23024.
- 5 LIEN, S.; et al. Two novel polymorphisms in the bovine obesity gene (OBS). *Animal*
6 *Genetics*, v.28, p.238–246, 1997. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1590/S1516-](http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982012000500025)
7 [35982012000500025](http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982012000500025)> Acesso em: 20 out. 2014. doi: /10.1590/S1516-35982012000500025.
- 8 REN, D. X. et al. Genotyping of the kcasein and β -lactoglobulin genes in Chinese Holstein,
9 Jersey and water buffalo by PCR-RFLP. **Journal of Genetics**, v. 90, n. 1, 2011. Disponível
10 em: <<http://www.ias.ac.in/jgenet/OnlineResources/90/e1.pdf>>. Acesso em: 13 out. 2014.
- 11 SOUZA, F. R. P. et al. Assessment of *DGATI* and *LEP* gene polymorphisms in three Nelore
12 (*Bos indicus*) lines selected for growth and their relationship with growth and carcass traits.
13 **Journal of Animal Science** v.88, p.435-441, 2010. Disponível em:
14 <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19820053>> Acesso em: 13 out.2014. doi
15 10.2527/jas.2009-2174.
- 16 TERMAN, A. Effect of the polymorphisms of prolactin receptor (PRLR) and leptin (LEP)
17 genes on litter size in Polish pigs. **Journal of Animal Breeding and Genetic**, Oxford, v.122,
18 2005. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16274424> doi: 10.1111/j.1439-
19 0388.2005.00547.x
- 20 TONHATI, H. et al. Repetibilidade e fatores ambientais que afetam algumas características
21 produtivas nos bubalinos, Viçosa, MG, 1988. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE
- 22 ZHANG, Y. et al Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue.
23 **Nature**, 1994. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7984236> doi:
24 10.1038/372425a0

1 ZETOUNI. L. et al. Effects of a single nucleotide polymorphismin the leptin gene on the
2 productive traits of dairy buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Molecular Biology Reports**.
3 Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11033-013-2618-z>> Acesso
4 em: 30 nov.2014. doi: 10.1007/s11033-013-2618-z.

5

6

Tabela 1 – Distribuição genotípica do polimorfismo do gene da leptina 1620 (A/G) em búfalas da raça Murrah de duas fazendas da região nordeste de Brasil (Pernambuco - PE e Alagoas - AL).

Genótipo	Fazenda				Grupo total		Valor de p
	PE		AL				
	N	%	N	%	N	%	
AA	18	23,1	11	18,0	29	20,9	$p^{(1)} = 0,240$
AG	42	53,8	28	45,2	70	50,4	$p^{(1)} = 0,224$
GG	18	23,1	22	36,1	40	28,8	$p^{(1)} = 0,068$
Total	78	100	61	100,0	139	100	

(1): Através do teste Qui-quadrado de Pearson.

Tabela 2 – Análise das variáveis de lactação relacionados com polimorfismo no gene da leptina 1620 (A/G) em búfalas de raça Murrah em de duas fazendas da região nordeste de Brasil (Pernambuco e Alagoas) (n=139)

Variável	Genótipos			Valor de p
	AA	AG	GG	
	Média ± DP (Mediana)	Média ± DP (Mediana)	Média ± DP (Mediana)	
Produção leiteira (1)	1.803,89 ± 628,02 (1.708,90)	1.694,93 ± 546,78 (1.577,40)	1.969,41 ± 594,12 (1.875,00)	p ⁽¹⁾ = 0,093
Dias de lactação (Dias)	284,41 ± 74,40 (271,00)	276,61 ± 63,05 (269,00)	301,76 ± 70,36 (294,00)	p ⁽¹⁾ = 0,214
Produção média diária	5,62 ± 2,54 (5,47)	5,40 ± 2,65 (5,60)	5,44 ± 2,92 (5,60)	p ⁽²⁾ = 0,786

(1): Através do teste F (ANOVA).

(2): Através do teste de Kruskal-Wallis.

Tabela 3 – Análise entre as variáveis: quantidade de lactação e dias de lactação com o polimorfismo no gene da leptina entre búfalas de raça Murrah duas fazendas do Nordeste do Brasil (Pernambuco – PE e Alagoas – AL).

Variável	Genótipo	Fazendas		Valor de p
		PE	AL	
		Média ± DP (Mediana)	Média ± DP (Mediana)	
Produção leiteira	AA	1.624,57 ± 501,91 (1.595,22)	2.090,80 ± 726,02 (2.096,50)	p ⁽¹⁾ = 0,060
	GA	1.434,28 ± 362,45 (1.398,97)	2.229,25 ± 469,46 (2.190,00)	p ⁽¹⁾ < 0,001*
	GG	1.734,90 ± 505,30 (1.803,14)	2.218,56 ± 593,41 (2.118,00)	p ⁽²⁾ = 0,017*
Dias de lactação (Dias)	AA	294,71 ± 79,16 (277,00)	266,90 ± 65,63 (240,50)	p ⁽¹⁾ = 0,227
	GA	276,27 ± 70,10 (269,00)	277,30 ± 46,99 (268,50)	p ⁽²⁾ = 0,953
	GG	309,59 ± 72,98 (294,00)	293,44 ± 68,83 (289,50)	p ⁽²⁾ = 0,519

(*): Diferença significativa a 5,0%.

(1): Através do teste de Mann-Whitney. (2): Através do teste t-Student com variâncias iguais.

Tabela 4 – Análise das variáveis: pico da produção, peso ao nascer na fazenda e peso ao desmame na fazenda de Pernambuco por genótipo.

Variável	Genótipo			Valor de p
	AA	AG	GG	
	Média ± DP (Mediana)	Média ± DP (Mediana)	Média ± DP (Mediana)	
Pico da produção (L)	1.020,89 ± 419,75 (988,50)	928,05 ± 298,82 (913,00)	987,61 ± 257,73 (960,00)	p ⁽²⁾ = 0,873
Peso ao nascer (kg)	78,63 ± 96,91 (39,00)	82,95 ± 122,93 (40,00)	45,22 ± 34,21 (36,50)	p ⁽²⁾ = 0,084
Peso no desmame (kg)	558,61 ± 54,69 (541,00)	547,64 ± 64,93 (565,00)	559,06 ± 72,89 (580,00)	p ⁽²⁾ = 0,382

(*): Diferença significativa a 5%.

(1): Através do teste F (ANOVA) com comparações de Tukey.

(2): Através do teste de Kruskal-Wallis.

Obs. Se as letras entre parêntesis são distintas comprova-se diferenças significativas entre os genótipos correspondentes.