

SITUAÇÃO ATUAL DO BANCO DE DNA DE RECURSOS GENÉTICOS ANIMAIS NO BRASIL

PRESENT STATUS OF THE GENETIC RESOURCES DNA BANK IN BRAZIL

Egito, A.A.¹, M.S.M. Albuquerque¹, S.T.R. Castro¹, S.R. Paiva¹, J.R.F. Marques², C. McManus³, A.S. Mariante¹, U.P.G. Abreu⁴, S.A. Santos⁴, J.R. Sereno⁴, M.C.S. Fioravanti⁵, C.M. Vaz⁶, F.V. Nobre⁷, J.V. Oliveira⁸, J.H. de Carvalho⁹, M.R. Costa², M.N. Ribeiro¹⁰ e M.A. Lara⁸

¹Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. SAIN Parque Rural, cep 70770-900. Brasília. DF Brasil. E-mail: egito@cenargen.embrapa.br

²Embrapa Amazônia Oriental, Trav. Dr. Enéas Pinheiro s/n. Belém, PA. Brasil.

³Universidade de Brasília. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária. Brasília, DF. Brasil.

⁴Embrapa Pantanal. Caixa Postal 109. Corumbá MS. Brasil.

⁵Universidade Federal de Goiás. Caixa Postal 131. Goiânia-GO. Brasil.

⁶Embrapa Pecuária Sul. Caixa Postal 242. Bagé, RS. Brasil.

⁷Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Caixa Postal 1524. Campus Universitário Lagoa Nova. Natal, RN. Brasil.

⁸Instituto de Zootecnia. Rua Heitor Penteado, 56, Nova Odessa, SP. Brasil.

⁹Embrapa Meio-Norte. Av. Duque de Caxias, 5650, Teresina, PI. Brasil.

¹⁰Universidade Rural de Pernambuco, R. Dom Manoel de Medeiros, s/n. Recife, PE. Brasil.

PALAVRAS CHAVE ADICIONAIS

Banco de DNA. Genética da conservação.

ADDITIONAL KEYWORDS

DNA Bank. Conservation genetics.

RESUMO

A conservação *ex situ* inclui a criopreservação de sêmen, ovócitos, embriões, células somáticas e DNA (FAO, 1998). Embora, no momento, não seja possível recuperar populações ou indivíduos a partir do DNA, o armazenamento deste têm sido útil para estudos populacionais, investigações epidemiológicas e outros. O Laboratório de Genética Animal (LGA) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – CENARGEN, trabalha com a caracterização de populações animais que estão incluídas no programa de conservação de recursos genéticos brasileiro desenvolvido pela Embrapa. Em para-

lelo aos trabalhos de conservação, foi montado um Banco de DNA, o qual possui amostras de diversas espécies. O DNA foi extraído de *pellets* de linfócitos criopreservados ou de *buffy coats*. Após a extração o DNA foi quantificado e teve sua integridade e qualidade checada. Cada amostra extraída foi dividida em pelo menos duas alíquotas, uma para ser usada em estudos de caracterização (-20°C) e a outra para ser estocada no Banco de DNA. (-80°C). Todos animais amostrados receberam um código e foram catalogados em um banco de dados, onde todas as informações viáveis estão registradas. O

Arch. Zootec. 54: 283-288. 2005.

refinamento de técnicas de biologia molecular aumenta a utilidade do material depositado, sendo um reservatório de importantes informações científicas. No momento, o banco do DNA do LGA possui espécimes de diversas raças de seis espécies domésticas, a maioria destas encontra-se em risco de extinção e estão envolvidas no programa de conservação da Embrapa. A conservação *ex situ* de DNA vem demonstrando sua utilidade útil na caracterização de populações de animais domésticos vinculados ao programa de conservação do Brasil. Este poderá ser o método de escolha quando muitas amostras de uma raça precisarem ser armazenadas.

SUMMARY

Ex situ conservation include the cryopreservation of genetic material: semen, oocytes, embryos, somatic cells and DNA (FAO, 1998). Although, it is not possible to regenerate whole animals from isolated DNA, it has been proved that DNA banking was useful in population genetic studies and epidemiological investigations. The Animal Genetics Laboratory (AGL) at Embrapa Genetic Resources and Biotechnology - Cenargen, Brasília - DF, Brazil, works with genetic characterization of animal populations that belong to the Brazilian conservation program. At the same time, a DNA Bank is being set up, which already has samples from several animals species. The DNA was extracted from cryopreserved leukocyte pellets or buffy coats. After extraction it was quantified and checked for its integrity and quality. Each specimen extracted was divided in at least two samples. One of them was used for characterization studies (-20°C) while the other was stored at -80°C at the DNA bank. All animals that were collected received a code number and were catalogued in a data bank where all the available information was registered. The refinement of molecular biology techniques increase the usefulness of banked material that will provide a ready reservoir of valuable scientific information.

At this time, the AGL DNA bank has specimens of several breeds of six domestic species. Most of these breeds are in risk of extinction and are involved in the Conservation Program of Embrapa/Cenargen. DNA banking is proving to be useful for characterization of domestic animal populations that are in Brazilian conservation program. In near future, it might be the method of choice when many representatives of a breed are to be stored.

INTRODUÇÃO

As técnicas para conservação de recursos genéticos animais envolvem a conservação *in situ* e *ex situ*. De acordo com a FAO (1998), a conservação *ex situ* inclui a criopreservação de sêmen, ovócitos, embriões, células somáticas e DNA. Embora ainda não seja possível recuperar animais completos a partir do DNA isolado, os bancos de DNA têm provado sua utilidade, na área humana, em investigações epidemiológicas e na pesquisa do câncer (Visvikis *et al.*, 1998).

Hetzel and Drinkwater (1992), citam que nos mamíferos superiores, ao redor de 3000 milhões de informações estão armazenadas em cada uma das células que compõe um organismo inteiro. Quando consideramos a conservação desta informação genética, se torna essencial o armazenamento ou a preservação de uma amostra que represente o organismo, sendo esta purificada e preservada de modo a manter a estrutura básica do DNA, pois a mesma é uma forma alternativa de permitir o acesso fácil a informação genética.

O desenvolvimento e o refinamento de técnicas de biologia molecular

SITUAÇÃO DO BANCO DE DNA DE RECURSOS GENÉTICOS ANIMAIS NO BRASIL

corroboram para a formação/manutenção de Bancos de DNA, os quais serão um reservatório de informações científicas. Além disto, não podemos esquecer a possibilidade futura de genes ou alelos de interesse serem descobertos em espécies que tenham se extinguido, sendo utilizados para a formação de animais transgênicos ou quiçá um organismo inteiro (Egito *et al.*, 2000).

Visando a caracterização das raças naturalizadas envolvidas no programa de conservação e recursos genéticos animais implantou-se, em 1998, o Laboratório de Genética Animal (LGA) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – CENARGEN e, desde o seu início, a equipe envolvida preocupou-se em formar um banco de amostras onde, além do DNA extraído, incluiu-se também hemácias e soro, para futuros trabalhos de caracterização genética. A ênfase inicial foi dada a raças de animais domésticos que se encontram em perigo de extinção e que já estavam envolvidos no Programa de Conservação de Recursos Genéticos Animais da Embrapa.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras que fazem parte do Banco de DNA localizado na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia foram obtidas em viagens de coleta realizadas pelos membros da equipe ou pelo envio de material biológico por parte de criadores ou responsáveis pelos Núcleos de Conservação de Recursos Genéticos Animais da Embrapa.

Para a coleta de sangue foram utilizados tubos a vácuo contendo EDTA como anticoagulante. As amostras

foram transportadas em gelo e processadas em até cinco dias para a separação dos componentes sanguíneos. Após uma centrifugação a 3000 rpm/10' a camada de leucócitos foi retirada e armazenada a -20°C para posterior extração. As hemácias foram lavadas com solução salina 0,9 p.100 sendo armazenadas e congeladas em tampão sódico contendo 40 p.100 de glicerol. As amostras de plasma e hemácias também foram armazenadas para futuros trabalhos envolvendo polimorfismos protéicos.

Após a extração do DNA, com protocolo pré-estabelecido no LGA baseado em um protocolo não orgânico otimizado (Miller *et al.*, 1988), o mesmo foi quantificado e teve sua qualidade e integridade conferida. Para a quantificação das amostras utilizou-se gel de agarose 1 p.100, corado com brometo de etídeo, o qual foi comparado com padrões de DNA de fago lambda. O grau de pureza foi avaliado, em um espectrofotômetro, pela relação obtida nos comprimentos de onda de 260/280nm. Cada amostra extraída foi subdividida em duas, sendo uma utilizada nos trabalhos de caracterização/genotipagem das populações no laboratório e a outra armazenada a -80°C (Banco de DNA).

Todas as amostras armazenadas possuem um código específico e estão cadastradas em um Banco de Dados, separado por espécie e raça, onde dentro de cada raça constam informações a respeito de cada animal coletado, como genealogia, sexo, descendência, data de nascimento, local de origem do animal e coleta do material, localização das amostras no Banco e outras informações pertinentes àquele indi-

víduo e ao processamento da amostra.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Atualmente, existem armazenadas no Banco de DNA do LGA 5769 amostras, sendo estas de onze raças ovinas (1360 amostras), doze raças eqüinas (692 amostras), quatro raças caprinas (700 amostras), cinco bubalinas (418 amostras), três asininas (166 amostras) e dezesseis bovinas (2433 amostras). A maioria das raças amostradas está envolvida no Programa de Conservação de Recursos Genéticos da EMBRAPA. A **figura 1** mostra a evolução do Banco no período de quatro anos, onde o número de amostras introduzidas triplicou neste período.

Pode-se verificar que em determinados períodos há uma introdução pre-

ferencial de determinadas espécies, o que pode ser atribuído ao desenvolvimento, àquela época, de trabalhos de caracterização genética com as mesmas (p.e. dissertações de mestrado).

Com o avanço das técnicas de biologia molecular, estas coleções poderão ser úteis para a pecuária nacional pela introdução de genes que confirmam características inexistentes em outras raças ou populações (transgênese). O potencial contido num Banco de amostras biológicas, como a existente no LGA, é indiscutível quando se leva em consideração a possibilidade de analisar, com diferentes marcadores e técnicas, amostras que estão conservadas há anos.

CONCLUSÕES

A criopreservação de biópsias e/ou

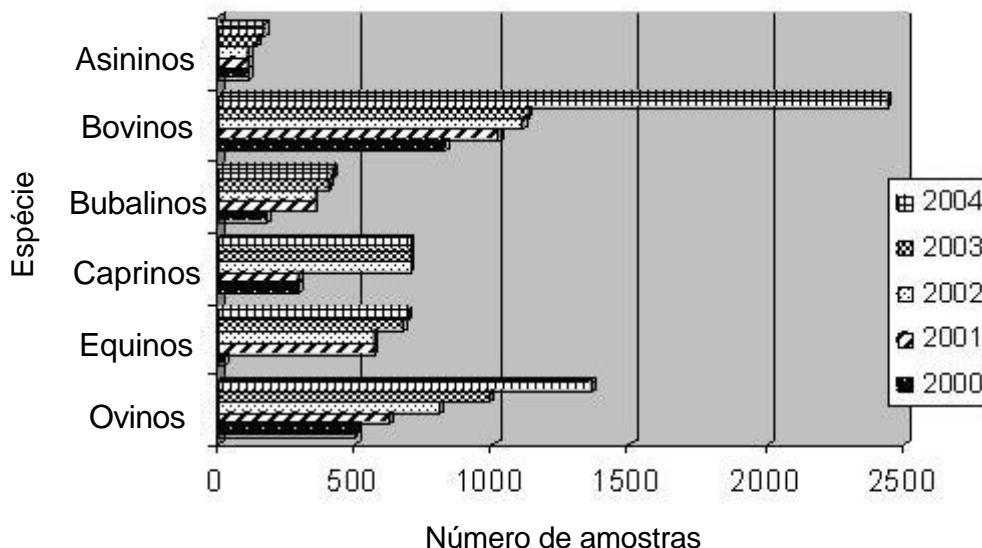


Figura 1. Evolução do Banco de DNA ao longo dos anos. (Evolution of DNA bank).

SITUAÇÃO DO BANCO DE DNA DE RECURSOS GENÉTICOS ANIMAIS NO BRASIL

estoques celulares é rotina em vários países do mundo porque a manutenção das mesmas constitui um repositório de informações genéticas de animais, mesmo após sua extinção total. Coleções compreendendo material biológico como DNA e tecidos vem demonstrando sua utilidade na caracterização de populações de animais domésticos vinculados ao programa de conservação do Brasil. Este poderá ser um dos métodos de escolha quando for necessário o armazenamento de amostras de uma raça.

Estratégias no sentido de se usar material biológico para agregar conhecimento a essas espécies é extremamente desejável, ainda mais após o grande crescimento das técnicas de biologia molecular. O refinamento destas tecnologias aumenta a utilidade do material depositado sendo um reservatório de importantes informações científicas. O material armazenado até o momento viabilizou diversos trabalhos científicos incluindo treinamentos e estágios a estudantes de graduação, e o desenvolvimento de teses de pós-graduação.

A formação do Banco de DNA aconteceu de forma gradativa. As coletas de sangue foram feitas por pesquisadores da Embrapa ou das instituições parceiras, por ocasião das visitas técnicas aos núcleos de conservação ou por proprietários das fazendas particulares, o que vem reforçar a importância das parcerias na formação deste Banco. Esse esforço conjunto tem resultado na publicação de diversos trabalhos científicos, no desenvolvimento de dissertações de mestrado e teses de doutoramento, além de estar viabilizando treinamentos e estágios a estudantes de graduação.

Além disto o armazenamento de DNA tem demonstrado sua utilidade na caracterização de populações de animais domésticos uma vez que dados obtidos a partir de marcadores moleculares estão sendo cada vez mais utilizados como uma ferramenta para auxiliar a conservação de raças e espécies em extinção, bem como para auxiliar trabalhos envolvendo a busca de marcadores moleculares que possam estar associados a características de interesse econômico.

BIBLIOGRAFIA

- Egito, A.A., M.S.M. Albuquerque, C.R. Gasparotto, S.T.R. Castro, C. McManus and A.S. Mariante. 2000. DNA Banking - another option on conservation strategy. In: Fifth Global Conference in Conservation of Domestic Animal Genetic Resources, 2000, Brasília. Fifth Global Conference in Conservation of Domestic Animal Genetic Resources. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. CDROM, CD97.
- FAO. 1998. Secondary guidelines for development of National Farm Animal Genetic Resources Managements Plans: management of small populations at risk. FAO, Rome, Italy. 215 p.
- Hetzel, D.J.S. and R.D. Drinkwater. 1992. The Use of Technologies for the Conservation and Improvement of Animal Genetic Resources. In: The Management of Global Animal Genetic Resources. Proceedings of FAO Expert Consultation. Rome, Italy, p. 251-269.
- Miller, S.A., D.D Dykes and H.F. Polesky. 1988. A simple setting out procedure for extracting

Archivos de zootecnia vol. 54, núm. 206-207, p. 287.

EGITO ET AL.

DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 16: 1215.
Visvikis, S., A. Schlenck and M. Maurice. 1998.

DNA extraction and stability for epidemiological studies. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 36: 551-555.

Archivos de zootecnia vol. 54, núm. 206-207, p. 288.