

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

EMANOELE CRISTINA WEISS

**DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MOLECULARES ESPECÍFICOS PARA
PRODUÇÃO DE LEITE EM BÚFALOS (*Bubalus bubalis*)**

DOIS VIZINHOS

2021

EMANOELE CRISTINA WEISS

**DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MOLECULARES ESPECÍFICOS PARA
PRODUÇÃO DE LEITE EM BÚFALOS (*Bubalus bubalis*)**

**Development of specific molecular markers for milk production in buffalo
(*Bubalus bubalis*)**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Zootecnia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Produção, Nutrição E Ambiência De Ruminantes

Orientadora: Prof.^a Dr^a Emilyn Midori Maeda

Coorientadora: Prof.^a Dr^a Juliana Morini Küpper Cardoso Persequini

DOIS VIZINHOS

2021



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/)

Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, mesmo para fins comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es) e que licenciem as novas criações sob termos idênticos. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



**Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Dois Vizinhos**



EMANOELE CRISTINA WEISS

**DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MOLECULARES ESPECÍFICOS PARA PRODUÇÃO DE LEITE
EM BÚFALOS (BUBALUS BUBALIS)**

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestre Em Zootecnia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).
Área de concentração: Produção Animal.

Data de aprovação: 17 de Agosto de 2021

Prof.a Emilyn Midori Maeda, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof.a Betty Cristiane Kuhn, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof.a Candida Camila Dos Reis, Doutorado - Miolar Alimentos Ltda

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 17/08/2021.

Dedico este trabalho à minha família, e a todas as
pessoas que surgiram no meu caminho auxiliando
nessa jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida, por ter me dado força e coragem para vencer mais essa etapa na minha vida, a São Pio de Pietrelcina pelas graças alcançadas durante o mestrado, agradeço a Virgem Maria pela proteção e por ter sempre iluminado o meu caminho.

Agradeço aos meus pais, Volnei Weiss e Marlides Wilmes Weiss, pelo dom da vida e por sempre me apoiarem e me incentivarem em todos os momentos, nunca me deixando desistir.

Agradeço aos meus irmãos Elvionei Weiss e Ana Paula Weiss e demais familiares, pelo apoio e incentivo em todos os momentos.

Agradeço ao meu namorado Marcos Eduardo da Silva Santos pelo amor e paciência, por estar do meu lado em todos os momentos e nunca me deixou desistir.

Agradeço a minha amiga Carmen, pela parceria no laboratório e durante todo o mestrado pelas trocas de conhecimento.

Agradeço a minha orientadora Emilyn Midori Maeda que me acolheu e sempre foi um anjo na minha vida.

Agradeço a minha Coorientadora Juliana Morini Küpper Cardoso Perseguini pelos ensinamentos, paciência e amor.

Agradeço ao programa de Pós-Graduação em Zootecnia e a Universidade Tecnológica Federal do Paraná- campus Dois Vizinhos pela oportunidade de realizar o mestrado.

Agradeço os professores do programa de Pós-Graduação em Zootecnia pelos ensinamentos.

Agradeço os colegas de laboratório, pelo auxílio e conhecimentos compartilhados.

Agradeço a Coordenação de aperfeiçoamento de Nível Superior- Brasil (CAPES) -Código de Financiamento 001, pela concessão da bolsa de pesquisa.

Gratidão a todos!

“Para tudo há uma ocasião certa; há um tempo certo para cada propósito debaixo do céu: Tempo de nascer e tempo de morrer, tempo de plantar e tempo de arrancar o que se plantou”
Eclesiastes 3:1-2

RESUMO

O uso de marcadores moleculares é utilizado no melhoramento genético de bubalinos para verificar genes que estão ligados a características de interesse econômico, e posteriormente auxiliar na seleção de indivíduos superiores com maior produtividade. Assim, objetivou-se identificar e desenvolver marcadores moleculares específicos para genes relacionados com a produção de leite em *Bubalus bubalis*. Com o programa *Panther 16.0* foi efetuado o enriquecimento de função e via através da sequência genômica de *B. bubalis* para os genes relacionados a qualidade do leite (CSN1S1, CSN1S2, CSN2, CSN3, LALBA; FABP4; LPL; PPARG; SDC; DGAT1) disponíveis no banco de dados *National Center For Biotechnology Information* (NCBI). Com a ferramenta *String* foi construído uma rede interação proteína-proteína. A identificação e o designer dos primers, foi realizada com a utilização software *Primer-Blast*, com base no download das sequências no formato FASTA. A validação dos primers foi realizada *in silico* com a utilização do programa *SMS - PCR Primer Stats*, para confirmar a ausência de *hairpins* e dímeros. O BLASTn foi utilizado para verificar o alinhamento, e o programa *SMS PCR Products*, que procura locais de anelamento perfeito, e em laboratório, utilizando o material genético provenientes do bulbo folicular dos pelos da vassoura da cauda de 46 búfalos, 23 da raça Murrah e 23 da raça Mediterrâneo. O resultado da análise de enriquecimento de função e via dos genes candidatos para a qualidade do leite, demonstrou que eles estão associados com atividades biológicas complexas, incluindo a atividade lipídica, sintetização de lactose, regulação hormonal e atividade lipídica. A rede de interação proteína-proteína demonstra que existe uma interconexão entre os genes pesquisados, mas, a principal associação ocorre entre as proteínas do cluster das caseínas. Ao total foram desenvolvidos 100 primers, destes apenas 41 passaram em todos os testes e estão aptos para serem sintetizados. O número de marcadores específicos desenvolvidos para cada gene foi CSN1S1 (7); CSN1S2 (7); CSN2 (4); CSN3(5); LALBA (4); FABP4 (3); LPL (3); PPARG (4); SDC (2); DGAT1 (2). Os demais *primers* não se mostraram eficientes, sendo que não apresentaram padrões adequados para realização da genotipagem. Logo, pode-se concluir que por meio das análises de bioinformática é possível desenvolver *primers* eficientes, tanto para a PCR virtual quanto para a PCR em laboratório.

Palavras chaves: *Primers*; Búfalos; Produção Animal; Mineração *in silico*; Melhoramento Genético.

ABSTRACT

The use of molecular markers is used in the genetic improvement of buffaloes to verify genes that are linked to traits of economic interest, and subsequently assist in the selection of superior individuals with greater productivity. Thus, the objective was to identify and develop specific molecular markers for genes related to milk production in *Bubalus bubalis*. With the Panther 16.0 program, function and pathway enrichment was carried out through the genomic sequence of *B. bubalis* for genes related to milk quality (CSN1S1, CSN1S2, CSN2, CSN3, LALBA; FABP4; LPL; PPARG; SDC; DGAT1) available in the National Center For Biotechnology Information (NCBI) database. With the String tool, a protein-protein interaction network was built. The identification and design of the primers was performed using Primer-Blast software, based on the download of sequences in FASTA format. The validation of the primers was performed *in silico* using the SMS - PCR Primer Stats program, to confirm the absence of hairpins and dimers. BLASTn was used to verify alignment, and the SMS PCR Products program, which searches for perfect anneal sites, and in the laboratory, using genetic material from the follicular bulb of the tail broom hairs of 46 buffaloes, 23 Murrah and 23 of the Mediterranean race. The result of the function and pathway enrichment analysis of the candidate genes for milk quality demonstrated that they are associated with complex biological activities, including lipid activity, lactose synthesis, hormonal regulation and lipid activity. The protein-protein interaction network demonstrates that there is an interconnection between the genes studied, but the main association occurs between the proteins in the casein cluster. In total, 100 primers were developed, of which only 41 passed all tests and are ready to be synthesized. The number of specific markers developed for each gene was CSN1S1 (7); CSN1S2 (7); CSN2 (4); CSN3(5); LALBA (4); FABP4 (3); LPL (3); PPARG (4); SDC (2); DGAT1 (2). The other primers were not efficient, and they did not show adequate standards for genotyping. Therefore, it can be concluded that through bioinformatics analysis it is possible to develop efficient primers, both for virtual PCR and for PCR in the laboratory.

Keywords: Primers; Buffaloes; Animal Production; *In silico* mining; Genetical Enhancement.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Fotografia 1 - As quatro raças de búfalos reconhecidas no Brasil a) Mediterrâneo, b) Murrah, c) Jafarabadi e d) Carabao	18
Fotografia 2 - Fazenda Ditosa, Ipixuna do Pará	28
Fotografia 3 - Fazenda Ditosa, Ipixuna do Pará	29
Quadro 1 - Informações gerais dos animais.....	29
Fotografia 4 - Rede de PPI dos 10 genes candidatos para a característica de produção de leite em bubalinos, construída para <i>B. bubalis</i> (a) e <i>Bos taurus</i> (b)...	40
Fotografia 5 - Extração de DNA em gel 1,2% de agarose, com amostras de 1 a 23 da raça Mediterrâneo, da fazenda Três Irmãos, Soure-PA	45
Fotografia 6 - Extração de DNA em gel 1,2% de agarose, com amostras de 24 a 46 da raça Murrah, da fazenda Ditosa, Ipixuna do Pará- PA	45
Fotografia 7 - Genotipagem do primer Buf 01, do gene CSN1S1, sendo as amostras de 1 a 23 da raça Mediterrâneo e as amostras de 24 a 46 da raça Murrah.....	47
Fotografia 8 - Genotipagem do primer Buf 08, do gene CSN1S2, sendo as amostras de 1 a 23 da raça Mediterrâneo e as amostras de 24 a 46 da raça Murrah.....	48
Fotografia 9 - Genotipagem do primer Buf 18, do gene CSN2, sendo as amostras de 1 a 23 da raça Mediterrâneo e as amostras de 24 a 46 da raça Murrah.....	48
Fotografia 10 - Genotipagem do primer Buf 20, do gene CSN3, sendo as amostras de 1 a 23 da raça Mediterrâneo e as amostras de 24 a 46 da raça Murrah.....	49
Fotografia 11 - Genotipagem do primer Buf 33, do gene LPL, sendo as amostras de 1 a 23 da raça Mediterrâneo e as amostras de 24 a 46 da raça Murrah.....	49
Fotografia 12 - Genotipagem do primer Buf 40, do gene DGAT1, sendo as amostras de 1 a 23 da raça Mediterrâneo e as amostras de 24 a 46 da raça Murrah.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Genes candidatos a característica de produção de leite em <i>B. bubalis</i> ...	35
Tabela 2 - Análise de Enriquecimento de Função e Via com os genes candidatos para a característica de produção de leite em <i>B. bubalis</i>	37
Tabela 3 - Análise de Enriquecimento de Função e via para as classes de proteínas e caminhos para a característica de produção de leite em <i>B. bubalis</i>	39
Tabela 4 - Relação da quantidade de primers desenhados e validados por genes ..	43
Tabela 5 - Primers que passaram em todos os testes e estão aptos a serem sintetizados	48
Tabela 6 - A Valores de PIC e Heterosigozidade (H) para os 6 primers desenvolvidos	52

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	15
2.1	Objetivo geral	15
2.2	Objetivos específicos	15
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1	Características gerais dos bubalinos	16
3.2	Aspectos produtivos e econômicos da bubalinocultura	17
3.3	Melhoramento genético de bubalinos e marcadores moleculares ..	19
3.4	Reação em cadeia da polimerase (PCR)	20
3.5	Genes candidatos	20
3.5.1	Genes candidatos do cluster das caseínas	22
3.5.2	Gene candidato LALBA	22
3.5.3	Gene candidato PPARG	23
3.5.4	Gene candidato DGAT1	23
3.5.5	Gene candidato SCD	24
3.5.6	Gene candidato FABP4	24
3.5.7	Gene candidato LPL	24
4	MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1	Ética no uso de animais	26
4.2	Análises de bioinformática	26
4.2.1	Identificação dos genes que estão relacionados com a produção	26
4.2.2	Análise de enriquecimento da função e via dos genes candidatos	27
4.2.3	Construção da rede de interação proteína-proteína	27
4.2.4	Desenho dos Primers	27
4.3	Validação dos primers em laboratório	28
4.3.1	Animais e localização	28
4.3.2	Material Biológico	29
4.3.3	Extração do DNA genômico total.....	31
4.3.4	Seleção de <i>Primers</i> e Validação por PCR.....	32
4.3.5	Genotipagem e Conteúdo de Informação Polimórfica PIC	32
5	RESULTADOS E DISSCUSÃO	34
5.1	Identificação dos genes candidatos	34
5.2	Rede de interação de proteína-proteína	39
5.3	Designer dos primers	41
5.4	Validação dos marcadores moleculares em laboratório	45
5.4.1	Padronização da extração de DNA da espécie <i>B. bubalis</i>	45
5.4.2	Genotipagem dos géis de PCR	47

6	CONCLUSÃO	52
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	53
	REFERÊNCIAS.....	54
	ANEXO A - Tutorial das análises de bioinformática	62

1 INTRODUÇÃO

O búfalo (*Bubalus bubalis*) é uma espécie endêmica da Ásia, pertencente à família Bovidae, a qual foi introduzida nas Américas várias vezes desde 1895 (MISHRA *et al.*, 2020). Os Búfalos possuem grande importância econômica para vários países da Ásia, América do Sul, e para alguns países da Europa que possui rebanhos isolados (DUBEY, 2018). Os búfalos possuem uma parcela relevante na produção de leite, principalmente quando possuem manejo zootécnico adequado (KANISHT *et al.*, 2018). Um exemplo é a Índia, maior produtora de leite do mundo, e aproximadamente metade da sua produção vem de búfalos (FAO, 2009). No Brasil estima-se que a produção de leite de búfalo seja 92,3 milhões de litros ao ano, gerando um faturamento bruto de U\$ 55 milhões aos laticínios e cerca de U\$ 17 milhões aos criadores (ABCB, 2020).

Algumas características nos búfalos são interessantes e precisam ser mais estudadas, segundo a Associação Brasileira de Criadores de Búfalos-ABCB a carne de búfalo possui 40% menos colesterol, 12 vezes menos gordura, 55% de calorias a menos, 11% a mais de proteínas e 10 % mais minerais se comparada com a carne bovina. Outra característica importante é sobre o leite que possui 4% de proteínas, 8% de lipídios, 4,9% de lactose, 82% de água e 214 mg% de colesterol total, com rendimento superior nas indústrias de laticínios (ZICARELLI, 2004). Além disso, os búfalos possuem maior microbiota ruminal se comparados com bovinos, desta forma possui menor ingestão de matéria seca e maior digestibilidade, e apresentam maior aproveitamento de nitrogênio endógeno e de alimentos pobres em proteínas brutas (PAUL; LAL, 2010).

Para que essas características de interesse econômico se expressem fenotipicamente é preciso que os genes relacionados com a expressão destas, estejam presentes no genótipo do animal (ROSA; MENESES; EGITO, 2013). Uma técnica que vem sendo utilizada em bovinos é a identificação de genes através de marcadores moleculares, sendo que estes podem ser conceituados como etiquetas ou marcações de um ponto específico do genoma ou seja, eles são usados para marcar alelos que sejam de difícil identificação, como é o caso de características que são controladas pela expressão de muitos genes (RAMALHO, 2012). Os marcadores moleculares permitiram a análise de diversidade genética dentro e entre as espécies, além disso, eles possibilitam a caracterização de um grande número de

genótipos através de procedimentos relativamente simples, como também contribuem na identificação de marcadores para genes específicos conforme o interesse de cada pesquisador (BERED; NETO; CARVALHO, 1997).

Os marcadores moleculares codominantes possibilitam diferenciar os indivíduos homozigotos e heterozigotos, esses marcadores vêm sendo utilizados para análises de diversidade genética e identificação de genes, e outros estudos que estão ligados com a genética de populações, principalmente na determinação de padrões de sistema reprodutivo e fluxo gênico (BITTENCOURT; SEBBENN, 2007; SEBBENN *et al.*, 2011).

Os marcadores específicos para identificação de genes vêm sendo estudado por diversos autores (CORVA *et al.*, 2007; CHEN *et al.*, 2019). Stella *et al.* (2018) investigaram o perfil de expressão gênica dos genes CSF3 estimulador de colônias de granulócitos e o LOP lactoperoxidase, os produtos gênicos estão presentes no leite e são considerados genes candidatos para o estudo de mastite em búfalos. Chen *et al.* (2019) analisaram a expressão gênica relacionada com a deposição de gordura e marmoreio em bovinos.

Existem poucos estudos para desenvolver marcadores moleculares para a identificação de genes de interesse econômico em búfalos, e por esse motivo nota-se a necessidade de estudos nessa área. Ademais, o melhoramento genético de búfalos é uma atividade com potencial desenvolvimento tecnológico e é necessário que novos estudos tragam técnicas para aprimorar esse processo, melhorando assim a cadeia produtiva do Brasil. Parte inicial do texto, na qual devem constar o tema e a delimitação do assunto tratado, objetivos da pesquisa e outros elementos necessários para situar o tema do trabalho. Após o início de uma seção, recomenda-se a inserção de um texto ou, no mínimo, uma nota explicativa sobre a seção iniciada.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Identificar e desenvolver marcadores moleculares específicos para genes candidatos que estão relacionados com características de produção de leite em bubalinos.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar genes que estão relacionados com características de produção de leite em bubalinos;
- Realizar a análise de enriquecimento de função e via dos genes (CSN1S1, CSN1S2, CSN2, CSN3, LALBA, SCD, FABP4, LPL, DGAT1 e PPARG);
- Desenvolver uma rede de interação proteína-proteína para os genes (CSN1S1, CSN1S2, CSN2, CSN3, LALBA, SCD, FABP4, LPL, DGAT1 e PPARG);
- Desenvolver marcadores moleculares para os genes (CSN1S1, CSN1S2, CSN2, CSN3, LALBA, SCD, FABP4, LPL, DGAT1 e PPARG) de *Bubalus bubalis*.
- Validar os primers *in silico* por PCR (reação da cadeia da polimerase) virtual e através da PCR convencional.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Características gerais dos bubalinos

Os búfalos são mamíferos pertencentes à família *Bovidea* e subfamília *Bovinae* originários do continente asiático (GONÇALVES *et al.*, 2014). O gênero *Bubalus* é dividido em quatro espécies, sendo três selvagens (*B. depressicornis*; *B. quarlesi*; *B. mindorensis*) e uma doméstica *B. bubalis* (SINGH *et al.*, 2020).

A domesticação dos búfalos ainda há bastante controvérsias entre os estudos, e isso ocorre devido à carência de sequências de DNA de antigos búfalos selvagens e domesticados, que são fundamentais para consolidar a árvore filogenética do búfalo doméstico (CURAUDEAU *et al.*, 2021). Estudos morfológicos mostram que a domesticação ocorreu pela primeira vez na região do rio Yangtzi na China durante o período Neolítico a mais ou menos 7.000 anos atrás (BELLWOOD, 2005; BIBI; VRBA, 2010). Os estudos genéticos indicam que o original evento de domesticação foi no sul da Ásia (KIERSTEIN *et al.*, 2004; KUMAR *et al.*, 2007), sudeste da Ásia (LAU *et al.*, 1998) e na China (LEI *et al.*, 2007).

A domesticação dos bubalinos teve grande sucesso em vários locais do mundo, devido à grande adaptabilidade a gramíneas, pastagens de baixa qualidade, diferentes climas, chuvas irregulares, resistência a doenças e por possuírem longa vida produtiva (DEZFULI *et al.*, 2011). Atualmente os bubalinos são importantes animais de criação em diversos países, especialmente em pequenas propriedades (BORQUIS *et al.*, 2014).

Após a domesticação a espécie *B. bubalis* foi dividida em duas subespécies, primeiramente por meio de estudos morfológicos (MACGREGOR, 1941) e posteriormente por estudos genéticos (KUMAR *et al.*, 2006; YINDEE *et al.*, 2010) e mitocondriais (ZHANG *et al.*, 2016). Sendo as subespécies denominadas de *B. bubalis bubalis* (2n=50) e *B. bubalis kerebau* (2n=48) também conhecidos popularmente como búfalo da água/rio e búfalo do pântano, respectivamente (KUMAR *et al.*, 2007; SHI *et al.*, 2012).

Morfologicamente as duas variações são bem distintas, o búfalo do rio possui o corpo preto com chifres curvados enquanto o búfalo do pântano é cinza escuro com manchas brancas e possui os chifres mais alongados (ZHANG; COLLI; BARKER, 2019). Além das diferenças morfológicas, também há uma diferenciação

cromossômica entre as subespécies, pois ocorre a fusão no cromossomo 4 e 9 no *B. bubalis kerebau* (IANNUZZI, 1998).

3.2 Aspectos produtivos e econômicos da bubalinocultura

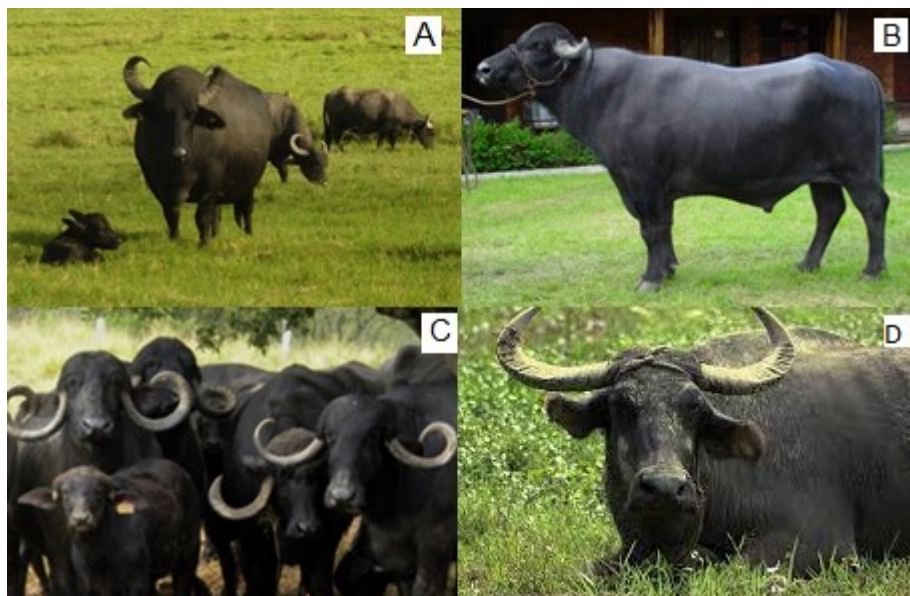
O búfalo da água *B. bubalis* atualmente pode ser encontrado nos 5 continentes com uma população global estimada em 205 milhões de animais (FAO, 2020; ZHANG; COLLI; BARKER, 2019). Para mais de 67 países os búfalos representam uma forma de subsistência com um importante papel socioeconômico (NAFIU *et al.*, 2018; FAO, 2020).

Eles possuem grande importância econômica para vários países da Ásia, América do Sul e para alguns países da Europa, a qual possui rebanhos isolados (DUBEY, 2018). Além de possuírem uma parcela relevante na produção de leite, principalmente quando possuem manejo zootécnico adequado (KANISHT *et al.*, 2018). Um exemplo é a Índia, maior produtora de leite do mundo e aproximadamente metade da sua produção vem de búfalos (DU *et al.*, 2019).

A China possui a segunda maior população de búfalos do mundo, eles são utilizados principalmente nas fazendas de arroz como ferramenta de tração (ZHANG *et al.*, 2016). No Irã os búfalos são considerados os principais produtores de carne e leite (DEZFULI *et al.*, 2011).

No Brasil a população de búfalos é estimada em 3 milhões de animais, com predominância na região norte, no Estado do Pará (BARROS *et al.*, 2018). Atualmente são reconhecidas quatro raças de búfalos pela Associação Brasileira de Criadores de Búfalos: Mediterrâneo, Murrah, Jafarabadi e Carabao (Fotografia 1).

Fotografia 1: As quatro raças de búfalos reconhecidas no Brasil a) Mediterrâneo, b) Murrah, c) Jafarabadi e d) Carabao



Fonte: ABCB (2021)

Para as populações ribeirinhas os búfalos representam uma forma de sustento, com importante papel socioeconômico, esses animais se adaptam a diferentes ambientes incluindo ao de pastagem de baixa qualidade e com baixa oferta de nutriente (NAFIU *et al.*, 2018).

Os búfalos vêm como uma alternativa de gado mestiço devido a sua grande adaptabilidade a condições ecológicas variadas, vitais para a vida dos pequenos agricultores, não são considerados apenas animais de tração, mas também uma fonte de carne, chifres, pele e, particularmente de leite, que pode ser convertido em cremes, manteiga, iogurte e muitos queijos (MICHELIZZI *et al.*, 2010). A produção e a qualidade do leite são importantes recursos para avaliar o desempenho da produção dos bubalinos (GIL *et al.*, 2013).

Em comparação com as vacas zebuínas, as búfalas produzem o litro de leite com custo inferior, e com a produtividade leiteira economicamente maior (ZETONI, 2012). Além disso, o leite de búfalas possui rendimento superior nas indústrias, e seus derivados possuem maior valor agregado, o que permite que a remuneração ao produtor e para a indústria seja duas vezes maior que o leite bovino (BERNARDES, 2007).

Em relação ao sabor, o leite de búfala é adocicado, ele apresenta a relação de cálcio e fósforo de 1:71, enquanto que essa mesma relação em bovinos é de

1:31, além de ser rico em vitaminas A e C, e o teor de proteína é de 5,2 enquanto no leite de vaca é 3,3% (ZETONI, 2012). O que torna o leite de búfala único é seu alto teor de sólidos totais, como a gordura, em torno de 8,0%, o que oferece um ótimo rendimento para produção de derivados, como a mozzarella (NASCIMENTO *et al.*, 1993). Porém, mesmo com elevado teor de gordura, o leite de búfalas apresenta menor concentração de colesterol por litro, quando comparado com o leite de bovinos (ZETONI, 2012).

Os búfalos são animais com grande potencial econômico que precisam ser mais estudados, principalmente na área de melhoramento e genômica animal, pois só assim será possível selecionar animais superiores para aumentar a produtividade em todo o mundo (DU *et al.*, 2019).

3.3 Melhoramento genético de bubalinos e marcadores moleculares

O melhoramento genético visa selecionar animais superiores para incrementar a produção, produtividade e a qualidade do produto em equilíbrio com a cadeia produtiva e as exigências de mercado (PEREIRA, 2012). Os resultados do melhoramento genético animal se devem ao conjunto de esforços entre diferentes pesquisadores de distintas áreas como estática, genética, informática (ROSA; MENESES; EGITO, 2013).

No Brasil, os programas de melhoramento genético são mais avançados para bovinos e existem poucos programas de melhoramento genético para bubalinos (GIL *et al.*, 2013). O Promebull- Programa de Melhoramento Genético de Búfalos com Inovação para o Estado do Pará é o de maior destaque no país, ele é desenvolvido pela Embrapa Amazônia Oriental e tem como objetivo principal atender a demanda dos produtores de búfalos de todo o país, abrangendo as áreas de Melhoramento Genético Animal, Genética, Genética Molecular, Reprodução, Economia e Tecnologia da Informação (MARCONDES *et al.*, 2007).

Nos bubalinos é possível observar níveis produtivos mais elevados graças à intensificação do processo de seleção, melhoramento genético e manejo dos animais (MALHADO *et al.*, 2008). Uma técnica que vem sendo bastante utilizada em bovinos é a seleção de genes candidatos por meio de marcadores moleculares, porém ainda há poucos estudos em bubalinos (RAMALHO, 2012).

Os marcadores moleculares permitem a análise da diversidade genética dentro e entre as espécies, além disso, eles possibilitam a caracterização de um grande número de genótipos através de procedimentos relativamente simples, como também contribuem na identificação de marcadores para genes específicos conforme o interesse de cada pesquisador (BERED; NETO; CARVALHO, 1997).

3.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para a utilização dos marcadores moleculares em laboratório é importante que os pesquisadores tenham conhecimento de uma outra técnica de biologia molecular, a PCR, ela é utilizada para fazer muitas cópias de uma região específica do DNA, ou seja ela permite replicar milhares de vezes uma pequena quantidade de DNA (ZHANG *et al.*, 2019).

A PCR é dividida em três etapas: A primeira é a desnaturação, onde o DNA genômico que contém a sequência que será amplificada é desnaturado ou separado por aquecimento a cerca de 95°C por 30 segundos, desta forma a dupla fita de DNA é aberta e forma uma fita simples. A segunda etapa é o anelamento ou hibridização, nessa etapa é utilizado os primers (marcadores moleculares) que irão complementar a fita oposta da sequência de DNA que será amplificada, a temperatura dessa etapa varia de 55 °C a 65 °C dependendo da espécie que está sendo estudada. A terceira e última etapa é a extensão com o molde já identificado, a enzima DNA-polimerase adiciona as bases complementares, formando uma nova fita e então tem-se novamente a duplicação da fita de DNA. Esse processo acontece a uma temperatura de 72°C, essas três etapas são repetidas aproximadamente de 20 a 30 vezes (REGITANO, 2001).

3.5 Genes candidatos

A identificação dos genes que estão ligados a expressão de características de interesse zootécnico é de suma importância para melhorar a acurácia da seleção de indivíduos superiores em um rebanho (TIZIOTO, 2014). Uma maneira pela qual é possível identificar os genes que estão ligados com a expressão de características econômicas é usar a seleção por genes candidatos, esta abordagem tem como base

o fato de que apesar de milhões de anos de divergência evolutiva, a função do gene é conservada na maioria das vezes (FITZPATRICK *et al.*, 2005).

Os genes podem ser candidatos quando estão localizados em regiões de características de interesse ou quando estão envolvidos com a via metabólica que codifica uma proteína que está ligada a expressão fenotípica de interesse (DAVID *et al.*, 2020). Atualmente alguns estudos foram publicados utilizando a abordagem de genes candidatos para bubalinos (ABO-AL-ELA *et al.*, 2014; CHENG *et al.*, 2017; DENG *et al.*, 2019; DU *et al.*, 2019a; DU *et al.*, 2019b).

Pesquisadores desenvolveram um estudo com o gene candidato do fator de crescimento semelhante à insulina 2 (IGF2) ela desempenha um importante papel no crescimento muscular e pode ser usado como um marcador para as estratégias de seleção de características de crescimento em animais de fazenda (ABO-AL-ELA *et al.*, 2014). Como resultado um novo polimorfismo de nucleotídeo único (SNP), C287A, foi detectado (ABO-AL-ELA *et al.*, 2014). Foi uma mutação não sinônima e levou à substituição do aminoácido glutamina (Q) por histidina (H). Três padrões diferentes de SSCP foram observados: AA, AC e CC, com frequências de 0,540, 0,325 e 0,135, respectivamente (ABO-AL-ELA *et al.*, 2014).

Cheng *et al.* (2017) pesquisaram sobre o gene do polipeptídeo beta do hormônio luteinizante (LHB) este gene tem sido considerado importante para comportamento e está associado com a qualidade do esperma. Neste estudo, quatro SNPs (g.276 T > C, g.377A > C, g.401T > C, e g.412A > G) foram detectados no gene LHB de 165 búfalos de água diretas e ao sequenciamento e identificação de picos de sobreposição, cada um dos quais foi associado a pelo menos um traço de qualidade do esperma, de volume de ejaculação, concentração de esperma, motilidades espermáticas pós-descongelamento e a normalidades de esperma por análise de qui-quadrado.

Em seu estudo os pesquisadores Deng *et al.* (2019) estudaram os genes relacionados à produção de leite - (BNIPL, TUBA1C, C2CD4B, DCP1B, MAP3K5, PDCD11, SRGAP1, GDPD5, BARX2, SCARA3, CTU2, e RPL27A) foram identificados e considerados como os genes hub (que possuem alto grau de ligação) porque foram envolvidos em múltiplas vias relacionadas à produção de leite.

Du *et al.* (2019) realizaram um estudo de Associação Genômica (GWAS) e identificaram 517 genes candidatos e 47 mutações locais que estavam associados com a produção de leite em bubalinos. Os pesquisadores também ressaltaram que

com o crescimento de estudos genômicos com bubalinos, estando de acordo com o objetivo proposto pela pesquisa.

3.5.1 Genes candidatos do cluster das caseínas

O cluster das caseínas é composto por quatro genes: Alfa caseína s1 (CSN1S1); beta caseína (CSN2); Alfa caseína s2 (CSN1S2) e Kapa caseína (CSN3) (COLLI *et al.*, 2018; NCBI, 2020). Esses genes são encontrados no cromossomo 7 de *B. bubalis* (NCBI, 2021). O CSN1S1 e o CSN1S2 têm como função principal o transporte fosfato de cálcio no leite, o CSN2 é responsável pela determinação das propriedades superficiais das micelas de caseína, e CSN3 estabiliza a formação de micelas, evitando a precipitação da caseína no leite (UNIPROT, 2021).

Em mamíferos esses genes são altamente conservados e estão ligados com a produção de leite, além disso, as proteínas ligadas ao cluster das caseínas representam 80% da constituição do leite (HAUG *et al.*, 2007). As caseínas que constituem o leite de búfala são benéficas a saúde humana e contribuem com a formação óssea e são consideradas antioxidantes (BARRERO *et al.*, 2021).

As caseínas possuem grande expressão em diferentes fases da lactação em búfalos da raça Murrah, e são os principais componentes do leite (SHARMA *et al.*, 2019). Alfa caseína s1 constitui 38% das proteínas totais do leite (SUKLA *et al.*, 2007) e foi estudada por Li *et al.* (2020), os autores identificaram os polimorfismos desse gene e a sua relação com formação de peptídeos bioativos durante a digestão gastrointestinais simulada em bubalinos.

3.5.2 Gene candidato LALBA

O gene da alfa-lactalbumina (LALBA) é encontrado no cromossomo 4 de *B. bubalis* (NCBI, 2020) e tem como principal função a subunidade reguladora da sintase da lactose e altera a especificidade do substrato da galactosiltransferase na glândula mamária, tornando a glicose um bom substrato aceptor para esta enzima. Isso permite que a alfa-lactalbumina sintetize a lactose, o principal componente de carboidrato do leite. Em outros tecidos, a galactosiltransferase transfere a galactose para a N-acetilglucosamina das cadeias de oligossacarídeos nas glicoproteínas (UNIPROT, 2020).

A alfa-lactalbumina está presente no leite de búfalos em todas as fases da lactação, em especial na fase inicial, sendo juntamente com as caseínas um importante componente (SHARMA *et al.*, 2019). Porém, há poucos estudos sobre esse gene em bubalinos.

Pesquisadores identificaram as regiões polimórficas do gene alfa-lactalbumina em búfalos ribeirinhos e concluíram que o gene LALBA pode sofrer uma duplicação em búfalos, isso ocorre por causa dos arranjos genéticos (DAYAL *et al.*, 2005).

3.5.3 Gene candidato PPARG

O gene Receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma (PPARG) é um dos membros da família de receptores de hormônio nuclear, e tem como principal função a diferenciação e metabolismo de carboidratos e lipídios (APRILE *et al.*, 2014). Esse gene está localizado no cromossomo 21 de *B. bubalis* (NCBI, 2020).

Existem poucos estudos com o gene PPARG em bubalinos, um exemplo é o trabalho dos autores Zhou *et al.* (2020) que isolaram, identificaram e verificaram a expressão do gene PPARG nas glândulas mamárias de búfalas. Como resultado eles encontraram duas transcrições (PPARG1 e PPARG2) e 8 variantes de *splicing*. Este estudo dá um caminho para as futuras pesquisas e confirma o papel do gene na síntese de gordura, nesse caso especificamente no leite.

3.5.4 Gene candidato DGAT1

O gene diacilglicerol O-aciltransferase 1 (DGAT1) está localizado no cromossomo 15 de *B. bubalis* (NCBI, 2020). A função desse gene está relacionada com o metabolismo dos glicolipídios, que fazem parte do metabolismo dos lipídios (UNIPROT, 2020). É considerado um gene candidato pois está envolvido com a gordura do leite e deposição de gordura muscular (CASES *et al.*, 1998).

Esse gene codifica 489 precursores de aminoácidos e possui 32 aminoácidos de peptídeo sinal (VENKATACHALAPATHY *et al.*, 2008). Além disso, a sequência mRNA do gene DGAT1 é muito semelhante a de outros mamíferos como o gado (98,4%), porco (90,7%), macaco (85,4%), humano (85,0%), camundongo (77,4%) e rato (77,1%,) (VENKATACHALAPATHY *et al.*, 2008).

Até o momento poucos estudos foram realizados com o gene DGAT1 em bubalinos (FREITAS *et al.*, 2016; VENKATACHALAPATHY *et al.*, 2008). Estudos conduzidos pelos autores Freitas *et al.*, (2016) identificaram o polimorfismo do gene DGAT1 em búfalos da raça Murrah e investigaram as associações com a produção de leite e as características de qualidade (produção e porcentagem de gordura e proteína, contagem de células somáticas). Outro estudo realizado com o esse gene foi dos autores Venkatachalapathy *et al.*(2008) onde eles caracterizaram o gene DGAT1 em búfalos da raça Riverine.

3.5.5 Gene candidato SCD

O gene estearoil-CoA dessaturase (SCD) está localizado no cromossomo 23 de *B. bubalis* (NCBI, 2020). A sua função está ligada com a ligação de íon metálico, atividade estearoil-CoA 9-dessaturase e processos biossintéticos de ácidos graxos (UNIPROT, 2020).

A estearoil-coenzima A dessaturase (SCD) tem sido um gene candidato potencial para o teor de gordura do leite (MARYAM *et al.*, 2016). Li *et al.* (2016) confirmaram a associação do gene SCD com os ácidos graxos insaturados de cadeia média e longa do leite. Foram encontrados dois polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) (g.6926A> G e g.8646A> G) nos íntrons 3 e 4, e três SNPs (g.10153A> G, g.10213T> C e g.10329C> T) no exon 5.

3.5.6 Gene candidato FABP4

O gene da proteína de ligação de ácido graxo 4 (FABP4), está localizado no cromossomo 15 e possui (NCBI, 2020). A principal função desse gene é a ligação com ácidos graxos e regulação da resposta inflamatória (UNIPROT, 2020).

Em seu estudo os autores Jurek e colaboradores (2020) verificaram a relação do gene FABP4 com a transdiferenciação das células troncos derivadas do tecido adiposo.

3.5.7 Gene candidato LPL

O gene lipoproteína lipase (LPL) está localizado no cromossomo 3 de *B. bubalis* (NCBI, 2020). A enzimas desse gene são chave no metabolismo dos

triglicerídeos, desempenhado um papel importante na eliminação de lipídios da corrente sanguínea, armazenamento e utilização de lipídeos (UNIPROT, 2020). Pouco se sabe sobre o gene LPL em búfalos e a maioria dos estudos publicados são com bovinos.

Em bovinos o gene LPL foi relacionado com metabolismo e transporte de lipídeos, sendo um potencial gene candidato ligado com o crescimento, (MEI *et al.*, 2018). Wang *et al.* (2012) identificaram dois polimorfismos (T355420C e A355427T) que foram relacionados com o crescimento no gado, Xiangxi *et al.* (2013) identificaram três SNPs que estão relacionados com o desenvolvimento de carcaça e deposição de gordura.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Ética no uso de animais

Para dar início ao presente estudo o projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) sendo que, o mesmo foi dispensado segundo o protocolo 23064.002767/2020-86, pois o mesmo foi caracterizado como procedimento zootécnico comum.

4.2 Análises de bioinformática

Foram realizadas diversas análises de bioinformática, que envolvem inúmeros programas e parâmetros. Um tutorial foi elaborado para ser utilizado em análises posteriores com outros genes que possam ser de interesse comercial (Anexo II).

A escolha dos genes CSN1S1, CSN1S2, CSN2, CSN3, LALBA, LPL, PPARG, DGAT1 e FABP4, para o presente estudo, ocorreu baseado em trabalhos de revisão literária, sendo o principal entre eles, a pesquisa de Du *et al.* (2019), o qual identificou 517 genes candidatos para a característica de produção de leite em *B. Bubalus*.

4.2.1 Identificação dos genes que estão relacionados com a produção

Para identificação dos genes candidatos foi utilizada a sequência pública do genoma de *B. bubalis* (UOA_WB_1) disponível no banco de dados da *National Center for Biotechnology Information* (NCBI)- (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). O download foi realizado no formato FASTA do GenBank e aberto no programa Artemis versão 13.2.0 (<https://www.sanger.ac.uk/science/collaborations>), pois ele é uma ferramenta de navegação e anotação de genomas que permite a visualização de características das sequências de DNA.

Posteriormente foi utilizada a ferramenta BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para auxiliar na identificação das funções dos genes, pois ela possibilita a encontrar regiões de similaridade entre as sequências biológicas. Ademais, também foi feito uma mineração *in silico* no banco de dados do NCBI para identificar os genes que já foram descritos.

4.2.2 Análise de enriquecimento da função e via dos genes candidatos

A análise da ontologia dos genes foi realizada com o programa *PANTHER16.0 Released*. (<http://geneontology.org/>) utilizando as ferramentas: processos biológicos, função molecular e componentes celular. Em paralelo foi utilizado O KEGG-Enciclopédia de genes de Kyoto e Genomas (<https://www.genome.jp/kegg/>) que oferece a base sistemática das funções dos genes em termos de redes de genes e moléculas. Após as análises de GO e KEGG foi realizada a análise de enriquecimento da via de genes candidatos com o programa DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>) e $P < 0,05$ foi definido como estatisticamente significativo.

4.2.3 Construção da rede de interação proteína-proteína

Para construir uma rede de interação proteína-proteína foi utilizado banco de dados STRING (<https://string-db.org/>) que realiza Análise de enriquecimento funcional de redes de interação proteína-proteína. O software *Cytoscape* (<https://cytoscape.org/>) foi utilizado para visualizar a rede PPI resultante.

4.2.4 Desenho dos Primers

Para realizar o designer dos primers foi feito o download da sequência de cada gene no formato FASTA do banco de dados Gene do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term>), em seguida as sequências foram importadas para o programa *Primer Blast* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) onde foi realizado o designer dos primers específicos para identificar os genes candidatos de *B. bubalis*.

A validação dos *primers* de forma virtual foi realizada pelo programa *SMS PCR Products* (https://www.bioinformatics.org/sms2/pcr_products.html), ele identifica a localização dos primer e o produto de amplificação gerado após a PCR. Para ter certeza que os primers amplificam na região do gene de interesse, foi realizado o alinhamento com os programas BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e ClustalW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>).

Para verificar se os oligonucleotídeos não possuem “*hairpins*” (dobramentos da cadeia de um *primer*, fazendo com que ela se pareie consigo mesma) ou dímeros (são estruturas geradas pelo anelamento entre as bases do mesmo primer, ou hetero dímero onde ocorre a interação entre o primer Forward e Reverse na mesma PCR), foi utilizado a ferramenta *PCR Primer Stats* (https://www.bioinformatics.org/sms2/pcr_primer_stats.html).

4.3 Validação dos primers em laboratório

4.3.1 Animais e localização

O material genético dos animais utilizados nessa pesquisa pertence a espécie *B. bubalis*, representados por fêmeas das raças Murrah e Mediterrâneo, provenientes de duas fazendas localizadas no estado do Pará, Brasil. Sendo que a primeira raça pertence a fazenda Ditosa, localizada na cidade de Ipixuna do Pará (Fotografia 2), e a segunda raça pertence a fazenda 3 irmãos na cidade de Soure, Ilha de Marajó (Fotografia 3).

Fotografia 2: Fazenda Ditosa, Ipixuna do Pará



Fonte: WEISS (2021)

Fotografia 3: Fazenda Três Irmãos- Soure, Ilha de Marajó



Fonte: WEISS (2021)

4.3.2 Material Biológico

Foram coletadas amostras do pelo da vassoura da cauda de 46 búfalos, sendo 23 da raça Murrah e 23 da raça Mediterrâneo, todos com bulbo folicular íntegro e registrados na Associação Brasileira de Criadores de Búfalos (ABCB) como puros de origem (PO) (Quadro 1). As coletas foram feitas pelos proprietários e funcionários da fazenda, os quais já possuem larga experiência para realizar esta atividade, e tomaram todas as providências necessárias, para o preparo e higienização da região do animal onde foi realizada a coleta dos pelos.

Depois de coletadas, as amostras foram colocadas em sacos de papéis, identificadas individualmente por raça e pelo número de amostra, posteriormente foram armazenadas em temperatura ambiente até a extração do DNA. As análises laboratoriais aconteceram no laboratório de Biologia Celular e Molecular- LACEL da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Dois Vizinhos.

Quadro 1: Informações gerais de cada animal.

Nº PCR	Nº Registro	Nascimento	Peso	P.L/DIA	Raça	Fazenda
1	906	2004	580	5,8	Mediterrâneo	3 irmãos
2	925	2004	530	10,2	Mediterrâneo	3 irmãos
3	983	2005	540	13,6	Mediterrâneo	3 irmãos
4	1058	2006	565	12	Mediterrâneo	3 irmãos
5	1256	2008	530	13,4	Mediterrâneo	3 irmãos

Nº PCR	Nº Registro	Nascimento	Peso	P.L/DIA	Raça	Fazenda
6	1257	2008	560	14,8	Mediterrâneo	3 irmãos
7	1269	2008	480	4	Mediterrâneo	3 irmãos
8	2570	2008	455	7	Mediterrâneo	3 irmãos
9	2902	2008	525	6	Mediterrâneo	3 irmãos
10	2905	2008	615	8,98	Mediterrâneo	3 irmãos
11	3204	2009	560	6	Mediterrâneo	3 irmãos
12	3378	2009	520	9	Mediterrâneo	3 irmãos
13	3379	2009	500	6	Mediterrâneo	3 irmãos
14	3386	2009	520	6	Mediterrâneo	3 irmãos
15	3388	2009	450	6	Mediterrâneo	3 irmãos
16	3400	2009	480	6	Mediterrâneo	3 irmãos
17	3742	2013	430	8	Mediterrâneo	3 irmãos
18	3814	2011	520	5	Mediterrâneo	3 irmãos
19	3940	2011	480	6	Mediterrâneo	3 irmãos
20	4208	2012	540	6	Mediterrâneo	3 irmãos
21	4212	2012	540	9	Mediterrâneo	3 irmãos
22	4508	2013	540	8	Mediterrâneo	3 irmãos
23	4799	2014	480	7	Mediterrâneo	3 irmãos
24	2847	2013	550	S/IN	Murrah	Ditosa
25	2763	2013	550	S/IN	Murrah	Ditosa
26	3460	2019	400	S/IN	Murrah	Ditosa
27	2246	2010	600	S/IN	Murrah	Ditosa
28	3077	2007	450	S/IN	Murrah	Ditosa
29	1949	2008	600	S/IN	Murrah	Ditosa
30	2418	2011	500	S/IN	Murrah	Ditosa
31	1912	2008	600	S/IN	Murrah	Ditosa
32	2767	2013	500	S/IN	Murrah	Ditosa
33	2701	2013	450	S/IN	Murrah	Ditosa
34	1658	2007	650	S/IN	Murrah	Ditosa
35	3199	2017	450	S/IN	Murrah	Ditosa
36	3320	2017	450	S/IN	Murrah	Ditosa
37	3002	2014	500	S/IN	Murrah	Ditosa
38	2272	2010	550	S/IN	Murrah	Ditosa
39	2001	2009	600	S/IN	Murrah	Ditosa
40	2907	2014	500	S/IN	Murrah	Ditosa
41	3265	2016	450	S/IN	Murrah	Ditosa
41	3265	2016	450	S/IN	Murrah	Ditosa
42	3095	2015	450	S/IN	Murrah	Ditosa
43	3088	2015	450	S/IN	Murrah	Ditosa
44	2025	2009	500	S/IN	Murrah	Ditosa
45	2699	2012	500	S/IN	Murrah	Ditosa
46	3238	2016	450	S/IN	Murrah	Ditosa

Legenda: Nº PCR: número na reação em cadeia da polimerase; Nº Registro: número de registro dos animais; P.L/DIA: produção de leite por dia de cada animal em litros. **Fonte: WEISS (2021)**

4.3.3 Extração do DNA genômico total

Para a extração do DNA genômico total foi utilizado o protocolo da *Wizard genomic DNA Purification – Promega 2 Animal Tissue*, com algumas alterações para a espécie.

Os seguintes passos foram utilizados para a realização da extração do DNA:

- 1) Foram separados aproximadamente 40 pelos com bulbos foliculares íntegros, devidamente cortados.
- 2) Os pelos foram transferidos para um tubo graduado livre de DNase e RNase de 1,5 ml e adicionado 600 µl de *Nuclei Lysis Solution*, e foram levados para o vortex por 15 segundos.
- 3) Depois os tubos foram incubados em banho maria por 30 minutos na temperatura de 65°C, e após o processo foi adicionado 17,5 µl de proteinase K e 200 µl de *Protein Precipitation Solution*.
- 4) Na sequência os tubos foram levados para o freezer por 5 minutos e depois as amostras foram centrifugadas a 1500 RPM por 5 minutos.
- 5) O sobrenadante foi transferido para um tubo graduado livre de DNase e RNase de 2 ml contendo 600 µl de isopropanol gelado, sendo posteriormente invertido cuidadosamente por 5 vezes
- 6) Logo após foram centrifugadas as amostras a 15000 RPM por 10 minutos e adicionado 600 µl de etanol absoluto (álcool etílico) 99,9% de pureza (MERCK) e invertido cuidadosamente por 5 vezes para lavar o pellet.
- 7) Ao final foi descartado o sobrenadante e colocado os tubos para secarem sobre o papel absorvente por 1 hora, depois foi adicionado 100 µl de *DNA Rehydration Solution* e armazenado as amostras no freezer -20 °C.

Após a extração de DNA foram realizadas as quantificações através de eletroforese em gel de agarose 1,2% (Low EEO) com tampão TBE (LGC-Tris/Borato/EDTA). Para a preparação do gel de agarose foi utilizado 10 ml de tampão TBE (LGC); 90 ml de água destilada e 1,2% de agarose normal (Low EEO). Os reagentes foram misturados e levados ao micro-ondas por aproximadamente um minuto, e a após esse processo o conteúdo foi transferido para uma placa com os pentes e aguardado o gel solidificar.

Esse gel é posto na cuba com o tampão, a qual encontra-se ligada à uma fonte para que o DNA migre no gel. A cuba e a fonte fornecem a corrente necessária

para que ocorra uma corrida uniforme. Na cuba foi programado a voltagem de 80 volts, por 1 hora. Após o tempo necessário, foi realizada a revelação do gel, ou seja, a leitura da quantificação. As imagens foram capturadas pelo Transiluminador UV LTB-HE Loccus Biotecnologia LPS 4000v com fotodocumentador utilizando o programa LPix Image STi.

4.3.4 Seleção de *Primers* e Validação por PCR

Depois de realizar as análises dos primers *in silico*, foram selecionados 6 *primers* para serem amplificados através da PCR convencional, onde foi utilizado 4 µL de DNA purificado, 4,5 µL de Master Mix (Sinapse FIREPol 5x) e 1,0 µL de cada *primer* (Exxtend), 1,5 µL de água mili-Q para um volume final de 15 µL de reação, conforme procedimento descrito por Pepineli *et al.* (2014) com algumas modificações conforme as exigências da espécie *B. bubalis*.

A programação do Termociclador utilizado possui 35 ciclos sendo dividida nos seguintes passos:

- Primeiro passo: 94°C por 10 minutos para desnaturação inicial;
- Segundo passo: 94°C por 45 segundos minuto para desnaturação;
- Terceiro passo: 59°C por 45 segundos para anelamento dos iniciadores;
- Quarto passo: 72°C por 45 segundos para extensão final;
- Quinto passo: 72°C por 10 minuto para extensão final do DNA.

O segundo até o quarto passo foi repetido 35 vezes.

Após a PCR as amostras foram quantificadas em gel de agarose 2,4% utilizando 3 µl de GelRed para corar as amostras, 2 µl de *Stop Buffer* (Azul) e 5 µl de DNA. Posteriormente a esse procedimento as amostras foram levadas para a eletroforese por 1 hora em 80 volts, como parâmetro de tamanho de fragmentos foi utilizado um Ladder da marca LudwigBiotec de 100 pares de bases. Em seguida os géis foram foto documentados através do transiluminador.

4.3.5 Genotipagem e Conteúdo de Informação Polimórfica PIC

Os primers foram analisados pelo número de alelos por loco, pela frequência alélica por loco e pelo conteúdo de polimorfismo (PIC) dado pela expressão:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^x f_i^2$$

Onde f_i é a frequência do i -ésimo alelo para uma dada marca, somado ao longo dos n alelos (LINCH; WALSH, 1998). O PIC fornece uma estimativa do poder discriminatório do loco, considerando o número de alelos que são expressos e também as frequências relativas destes alelos. A leitura das bandas polimórficas foi realizada de acordo com o peso molecular de cada alelo.

5 RESULTADOS E DISSCUSÃO

5.1 Identificação dos genes candidatos

Foram selecionados 10 genes do banco de dados de bubalinos do NCBI, relacionados a produção de leite em bubalinos (Tabela 1), sendo que, a escolha foi baseada nos genes que tem a maior percentagem na expressão da característica com base na revisão sistemática apresentada por Du *et al.* (2019), sendo que no total 517 genes foram considerados candidatos, destes, um total de 19 genes foram identificados usando a abordagem gene candidato, e os outros 499 foram identificados através de 6 trabalhos de associação do genoma-GWAS (WU *et al.*, 2013; VENTURINI *et al.*, 2014; CAMARGO *et al.*, 2015; EL-HALAWANY *et al.*, 2017; IAMARTINO *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2017).

Tabela 1: Genes candidatos para a característica de produção de leite em bubalinos.

Nome do Gene	Função	ID do gene	Sequência	Crs	Localização (em par de bases - pb)
CSN1S1	Leite	102396531	NC_037551.1	7	32146994-32164041
CSN1S2	Leite	102395699	NC_037551.1	7	32020707-32039442
CSN2	Leite	102396229	NC_037551.1	7	32118803-32127683
CSN3	Leite	102395364	NC_037551.1	7	31914822-31928057
LALBA	Leite	102410146	NC_037548.1	4	89111526-89113254
FABP4	Leite	102410448	NC_037559.1	15	37653377-37657605
LPL	Leite	102412415	NC_037547.1	3	129634963-129659186
PPARG	Leite	102399331	NC_037565.1	21	56707623-56924900
SCD	Leite	102401664	NC_037567.1	23	21067064-21082233
DGAT1	Leite	102390126	NC_037559.1	15	81682793-81693016

Legenda: ID do gene: Número de identificação dos genes; Crs: Cromossomos que os genes estão localizados.

Fonte: WEISS (2021)

Após a seleção dos 10 genes candidatos foi realizado uma análise de enriquecimento de função e via (ARFV) pelo programa Panther 16.0 para obter uma compreensão mais profunda desses genes candidatos. As anotações foram divididas em 3 categorias: Função Molecular, Processos Biológicos e Componentes Celulares (Tabela 2).

Tabela 2: Análise de enriquecimento de função e via com os genes candidatos para a característica de produção de leite para bubalinos.

Função Molecular	Nome do Gene	Enriquecimento (%)	FDR
(GO:0050252)	DGAT1	100	1.14E-02
(GO:0004144)	DGAT1	100	7,99E-03
(GO:0036041)	FABP4	100	2.30E-02
(GO:0005324)	FABP4	100	2,95E-02
(GO:0005488)	CSN1S2; SCD; LPL; PPARG	100	2.30E-02
(GO:0003824)	DGAT1; SCD; LPL	100	2.95E-02
(GO:0098772)	PPARG	100	8.62E-03
Processos Biológicos	Nome do Gene	Enriquecimento (%)	FDR
(GO:0005989)	LALBA	100	2.38E-03
(GO:0032570)	CSN1S1; CSN1S2; CSN2; LALBA; CSN3	100	1.18E-09
(GO:0010226)	FABP4	100	5,27E-03
(GO:0050872)	PPARG; LPL	100	7,94E-05
(GO:0055094)	PPARG; LPL	100	1.89E-02
(GO:0031960)	PPARG; LPL	100	1.24E-02
(GO:0019432)	DGAT1	100	1.36E-02
(GO:0032355)	CSN1S1; CSN1S2; CSN2; LALBA	100	9,34E-08
(GO:0009725)	CSN1S1; CSN1S2	100	1.58E-02
(GO:0060416)	FABP4	100	2.80E-02
(GO:0055088)	FABP4; DGAT1	100	4,80E-03
(GO:0031347)	PPARG; FABP4; CSN2	100	4,82E-03
Componentes Celulares	Nome do Gene	Enriquecimento (%)	FDR
(GO:0005796)	CSN1S1; CSN1S2; CSN2; CSN3	100	5.29E-08
(GO:0005615)	CSN1S1; CSN1S2; CSN2; CSN3; LALBA; SCD; PPARG; LPL; DGAT1	100	1.09E-02

Legenda: FDR: Taxa de Descoberta Falsa de Benjamini-Hochbergf

Fonte: WEISS (2021)

A análise mostrou que para função molecular os genes foram enriquecidos principalmente para: atividade da lactose sintase (GO:0004461); atividade do retinol O-graxo-aciltransferase (GO:0050252); atividade diacilglicerol O-aciltransferase (GO:0004144); ligação do ácido graxo (GO:0036041); atividade do transportador de ácido graxo (GO:0005324); ligação (GO:0005488); atividade catalítica (GO:0003824) e regulador (GO: 0098772). Para processos biológicos os genes foram enriquecidos para: resposta ao mineralocorticoide (GO:1903494); processo biosintéticos da lactose (GO:0005989); resposta à progesterona (GO:0032570); resposta celular ao íon de lítio (GO:0010226); diferenciação de glóbulos brancos (GO:0050872);

resposta à partícula de lipoproteína (GO:0055094); regulação do armazenamento de colesterol (GO:0031960); processo biosintéticos de triglicerídeos (GO:0019432); resposta ao estradiol (GO:0032355); resposta ao hormônio do crescimento (GO:0009725); diferenciação de células de gordura marrom (GO:0060416); homeostase do colesterol (GO:0055088) e regulação da resposta inflamatória (GO:0031347). Para os componentes celulares os genes foram enriquecidos para: lúmen de Golgi (GO:0005796) e espaço extracelular (GO:0005615). Os genes que foram associados as características apresentadas estão especificadas na Tabela 2.

Apesar de ter encontrado resultados semelhantes com os de Du *et al.* (2019) o presente estudo traz novas vias que complementam as que haviam sido descritas anteriormente, desta forma é possível explicar de maneira mais detalhada os processos relacionados com a produção de leite em bubalinos. Diante disso, para o armazenamento de gordura pode-se acrescentar a resposta à partícula de lipoproteína (GO:0055094) e a regulação do armazenamento de colesterol (GO:0031960); atividade do retinol O-graxo-aciltransferase (GO:0050252); atividade diacilglicerol O-aciltransferase (GO:0004144); ligação do ácido graxo (GO:0036041); atividade do transportador de ácido graxo (GO:0005324).

A análise ontológica para função molecular dos genes, demonstrou que a maioria dos resultados dessa categoria estão associados ao gene DGAT1. Em bubalinos esse gene está localizado no cromossomo 15 que possui a região QTL para características economicamente importantes para a produção de leite, particularmente o teor de gordura (CARDOSO *et al.*, 2015). Ademais, o Diacilglicerol O- aciltransferase é uma enzima microsossomal que catalisa a adição de acil-graxo coenzima A 1,2, diacilglicerol para produzir coenzima A mais triglicerol, sendo importante na lipogênese em muitos tecidos, incluindo a glândula mamária. O DGAT1 é um dos principais genes candidatos responsáveis por afetar porcentagem de gordura do leite (MIRSHA *et al.*, 2007).

O resultado encontrado é relevante pois em bubalinos a maior porcentagem de gordura do leite é fundamental para a indústria de laticínios. Na Itália, por exemplo, o leite de búfala é a principal matéria prima para a produção do queijo muçarela (COZENGA *et al.*, 2014) que é terceiro queijo mais produzido no país, ficando atrás do *Parmigiano Reggiano* e *Grana Padano* (ISMEA, 2009). Por possuir 1% a mais de proteínas do que o leite de vaca, o leite de búfalas fornece uma

produção de queijo relativamente maior, aumentando o rendimento final em 5% (ZICARELLI *et al.*, 2001).

Outro resultado obtido pela análise AEFV É o processo biosintético da lactose (GO:0005989) que está relacionado diretamente com o gene LALBA. Esse processo é importante pois a subunidade reguladora da lactose sintase altera a especificidade do substrato da galactosiltransferase na glândula mamária, tornando a glicose um bom substrato aceptor para esta enzima. Isso permite que a LS sintetize lactose, o principal componente de carboidrato do leite (UNIPROT, 2021).

Para componentes celulares a análise ontológica demonstrou que a maioria dos resultados desta categoria estão associados com o cluster das caseínas. Contudo, não foi possível encontrar resultados semelhantes sobre a utilização do sistema de classificação PANTHER, para AEFV em genes candidatos relacionados a qualidade do leite em *B. bubalis*. Diante do exposto, os resultados encontrados no presente estudo fornecem um maior entendimento dos componentes celulares desses genes.

A análise de GO para classes de proteínas e caminhos de vias também foi realizada (Tabela 3), a fim de complementar os resultados. As classes de proteínas foram enriquecidas para: regulador transcricional específico do gene (PC00264); enzima de interconversão de metabólito (PC00262) e proteína de armazenamento (PC00210). Os caminhos obtidos foram: biossíntese de 2- araquidonoilglicerol (P05726); biossíntese de andrógeno / estrógeno / progesterona (P02727); mapa de sinalização CCKR (P06959); via do receptor do hormônio liberador de gonadotrofina (P06664).

Em animais superiores as proteínas são os compostos orgânicos de maior número, cerca de 50% do peso seco dos tecidos, além de desempenharem diversas funções, elas estão presentes em todos os processos biológicos (NASCIMENTO *et al.*, 2010).

Para classes de proteínas o regulador transcricional específico do gene foi descrito para o gene PPARG. Esse resultado é importante para o estudo de genes candidatos, pois para que o gene possa ser expresso é necessário que ele seja transcrito em mRNA, sendo o principal ponto de controle da expressão genica (SNUSTAD; SIMMONS, 2008). Estudos recentes têm mostrado que as proteínas STAT (transdutor de sinal e ativador de transcrição) têm um espectro de funções no desenvolvimento da glândula mamária em bubalinos (HUGHES; WATSON, 2012).

Tabela 3: Análise de enriquecimento de função e via para classe de proteínas e caminhos para os genes candidatos para a característica de produção de leite para bubalinos.

Classes de proteínas	Nome do Gene	Enriquecimento de dobras (%)
(PC00264)	PPARG	100
(PC00262)	DGAT1; LPL	100
(PC00210)	CSN1S1; CSN1S2; CSN2; CSN3	100
Caminhos	Nome do Gene	Enriquecimento de dobras (%)
(P05726)	LPL	100
(P02727)	DGAT1	100
(P06959)	PPARG	100
(P06664)	PPARG	100

Fonte: WEISS (2021)

Os genes DGAT1 e LPL estão localizados na classe de proteínas da enzima interconversora de metabólito, ou seja, age para converter moléculas. E os genes CSN1S1, CSN1S2, CSN2 e CSN3 foram relacionados com as proteínas de armazenamento (PANTHER, 2021). O segundo resultado justifica-se porque as caseínas representam 80% das proteínas que constituem o leite de búfala (HAUG *et al.*, 2007).

Para as vias e caminhos que foram encontrados, a biossíntese de hormônios foi relatada como fundamental para melhorar a produção de leite. A grelina, por exemplo, é um hormônio gastrointestinal que atua na liberação do hormônio do crescimento e influencia o metabolismo geral do corpo. GIL *et al.* (2013) estudaram a influência da liberação do hormônio grelina na produção de leite em bubalinos, como resultados eles verificaram que o hormônio influencia a produção de leite, síntese de gordura e produção de proteínas.

Coleman *et al.* (2000) descreveram as vias de triglicerídeos (glicerol-3-fosfato e monoacilglicerol) em mamíferos. Em ambas as vias o diacilglicerol é convertido em triacilglicerol pela enzima diacilglicerol O-aciltransferase1. Essa enzima participa dos processos de absorção de gordura no intestino, e a na regulação da concentração de triacilglicerol no armazeno de gordura nos adipócitos.

Zhang *et al.* (2018a) e Zhang *et al.* (2018b) demonstraram que a diminuição da proliferação das células mamárias e regulação negativa da expressão de genes envolvidos na biossíntese de ácidos graxos e proteínas do leite tem relação com a inibição da via de sinalização da proteína quinase ativada por AMP e também desempenharam um papel importante na melhora da lactogênese e diferenciação da glândula mamaria durante a gravidez em búfalas.

5.2 Rede de interação de proteína-proteína

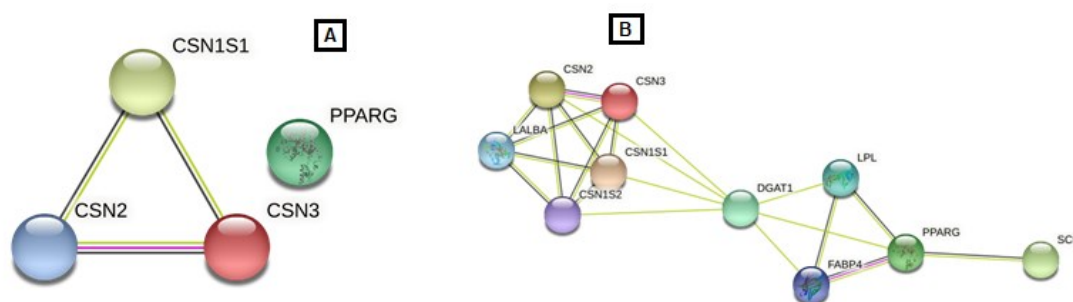
Para a análise de função e via ficar completa foi construído uma rede de interação proteína-proteína (PPI) com os 10 genes, utilizando o software *String* (Fotografia 5 - A) a pontuação de confiança $>0,4$ foi definida como critério para análise. Dos 10 genes estudados, quatro foram localizados na complexa rede de PPI, a qual é composta por 4 nós, 3 arestas, e o grau médio por nó é 1,5 e a média de agrupamento local é de 0,75.

As diferentes colorações dos nós representam determinadas informações: Os nós coloridos são proteínas consultadas e representam a primeira camada de interação, quando eles são preenchidos significa que as estruturas 3D das proteínas são conhecidas, porém quando ele está vazio significa que o banco de dados não encontrou nenhuma estrutura 3D para a proteína. Os nós brancos representam a segunda camada de interação.

A coloração das linhas também possui um significado, ou seja, indica o tipo de evidencia de interação: As linhas com coloração azul clara representam que os dados foram retirados de bancos de dados de curadoria, já as linhas rosas mostram que os dados foram definidos experimentalmente. As linhas vermelhas demonstram a fusão dos genes, as verdes representam a vizinhança das proteínas, as linhas com coloração azul escuro e preto demonstram a co-expressão das proteínas e as linhas amarelas demonstram que os dados foram através de mineração em textos.

A análise da rede PPI mostrou a formação de dois clusters, o das caseínas e da família de proteínas de ligação de lipocalina/ácido graxo citosólico, o qual o gene *PPARG* faz parte. Du *et al.* (2019) construíram uma rede PPI para 516 genes, porém só 378 genes caíram na complexa rede de PPI. Existem poucas informações das proteínas de *B. bubalis* nos bancos de dados, por esse motivo foi utilizado a rede de PPI fornecida pelo programa *String* com os 10 genes para *Bos taurus* a nível de comparação (Fotografia 5 - B).

Fotografia 5: Rede PPI dos 10 genes candidatos para a característica de produção de leite em bubalinos, construída com dados provenientes de *B. bubalis* (A) e *B. taurus* (B).



Fonte: WEISS (2021)

A rede de PPI de *B. taurus* possui 10 genes, 10 nós, 21 arestas, e o grau medio por nó é de 4,5 e a média do coeficiente de agrupamento é de 0,853. Formando o cluster das caseínas ligadas a proteinas do leite e segundo cluster que está ligados com a organização de particulas lipidicas. A forte ligação entre as caseínas e o gene LALBA demonstra que a expressão de um gene necessita dos demais, juntos os 5 genes representam as principais proteinas encontradas no leite de bufalas (BONFATTI *et al.*, 2012). O resultado encontrado, sobre a interligação das proteínas não foi encontrado em outros estudos, sendo um dado inédito. As caseínas são as fosfoproteínas responsáveis por cerca de 80% das proteínas totais, e o LALBA representa 18% das proteínas presentes no soro do leite (ELIGINI *et al.*, 2009).

Huda Mohamed *et al.* (2020) desenvolveu o seu trabalho com leite de *Camelus dromedarius*, investigando a relação do gene LALBA com os genes do cluster das caseínas. Nos resultados foi estimado a correlação de Person para vários fatores relacionados com a expressão das proteínas no leite, o que chamou a atenção foi a correlação altamente positiva ($r = 0,76$, $P < 0,01$) do gene LALBA com os genes presentes no cluster das caseínas.

As demais ligações que foram encontradas (Genes: LPL, DGAT, PPARG, FABP4 e SCD) estão relacionadas com a produção de gordura do leite, e estão presentes em diversos processos biológicos como regulação negativa do sequestro de triglicerídeos (GO:0010891); regulação do sequestro de triglicerídeos (GO: 0010889); processo catabólico de triglicerídeos (GO: 0019433); regulação do processo catabólico de triglicerídeos (GO: 0010896). A porcentagem de gordura é

importante para avaliar a qualidade do leite, bem como o seu rendimento final na indústria de laticínios. Casas *et al.* (2005) encontraram um QTL no cromossomo 14 de bovinos, esta região está associada a deposição de gordura nos músculos esqueléticos, e foi identificada em várias populações de bovinos, sendo que, os genes que estavam presentes são o DGAT1, FABP4, e o TG, esses genes estão associados tanto com a gordura da carne quanto a do leite.

5.3 Designer dos primers

Após realizar as análises de enriquecimento de função e via foram devolvidos *primers* para identificar o polimorfismo de cada gene. Através da ferramenta Primer-BLAST do NCBI, foram desenvolvidos os primers específicos a partir das sequências dos 10 genes pesquisados. No total foram desenhados 100 primers, dez para cada gene. Esses *primers* foram submetidos um a um em diferentes softwares para análise de sua eficiência. O primeiro programa que os *primers* foram submetidos foi o Clustal Ômega para verificar o alinhamento global e em seguida foi utilizado o BLASTn – NCBI o qual demonstra se existe um alinhamento significativo na sequência e espécie animal pesquisada. O terceiro Software empregado foi o SMS – PCR Primers Stats, o qual faz um relatório completo sobre a presença ou ausência de dímeros, harpins, auto anelamento, quantidade de guanina e citosina e temperatura de anelamento. De todos os iniciadores analisados, apenas 40 dos 100 primers passaram em todos os testes e estão aptos para serem sintetizados e testados em laboratório (Tabela 4).

Tabela 4: Relação da quantidade de primers desenhados e validados por gene candidato.

Espécie	Genes	Total de Primers	Primers validados
<i>B. bubalis</i>	CSN1S1	10	7
<i>B. bubalis</i>	CSN1S2	10	7
<i>B. bubalis</i>	CSN2	10	4
<i>B. bubalis</i>	CSN3	10	5
<i>B. bubalis</i>	LALBA	10	4
<i>B. bubalis</i>	FABP4	10	3
<i>B. bubalis</i>	LPL	10	3
<i>B. bubalis</i>	PPARG	10	4
<i>B. bubalis</i>	SCD	10	2
<i>B. bubalis</i>	DGAT1	10	1

Fonte: Weiss (2021).

Todos os primers que foram validados (Quadro 2) são indicados para serem sintetizados e podem ser utilizados em futuros estudos com genes candidatos em bubalinos, tendo em vista que eles não apresentam harpins, dímeros e passaram em todos os testes.

Quadro 2: Primers que passaram em todos os testes e estão aptos para serem sintetizados

Espécie	Nome do Gene	Primer	Sequência 5'-3'	Comp.	T°C	CP
<i>B. bubalis</i>	CSN1S1	BUF1	F: TCCACTAGGCACGCAATACC	20	58	138
			R: TGATAAGGCAACAATATGCAGTCA	24		
<i>B. bubalis</i>	CSN1S1	BUF2	F: TGACTGCATATTGTTGCCTTATCA	24	59	186
			R: GCACTGCTCCACATGTTCT	20		
<i>B. bubalis</i>	CSN1S1	BUF3	F: CACTAGGCACGCAATACCCT	20	59	137
			R: TTGATAAGGCAACAATATGCAGTCA	25		
<i>B. bubalis</i>	CSN1S1	BUF4	F: GCAATACCCTGATGCCCAT	20	59	194
			R: AACTAAGCTTTTATGTGTCATGCT	25		
<i>B. bubalis</i>	CSN1S1	BUF5	F: GCCTATCCATCTGGTGCCTG	20	59	167
			R: TGATAAGGCAACAATATGCAGTCAT	25		
<i>B. bubalis</i>	CSN1S1	BUF6	F: TCCCTAATCCCATCGGCTCT	20	59	162
			R: AACTAAGCTTTTATGTGTCATGC	24		
<i>B. bubalis</i>	CSN1S1	BUF7	F: ATGCCTATCCATCTGGTGCC	20	58	169
			R: TGATAAGGCAACAATATGCAGTC	23		
<i>B. bubalis</i>	CSN1S2	BUF8	F: TTCACCTGGCCCCAGTATCT	20	59	106
			R: AGGGAGAACTCACCACATAGG	21		
<i>B. bubalis</i>	CSN1S2	BUF9	F: TCACCTGGCCCCAGTATCTC	20	59	106
			R: AAGGGAGAACTCACCACATAGG	22		
<i>B. bubalis</i>	CSN1S2	BUF10	F: CCTATGTGGTGAGTTCTCCCTT	22	59	292
			R: ACCCACCTTCAGGAAATGCT	20		
<i>B. bubalis</i>	CSN1S2	BUF11	F: ATTCACCTGGCCCCAGTATC	20	59	106
			R: GGGAGAACTCACCACATAGGGA	22		
<i>B. bubalis</i>	CSN1S2	BUF12	F: GAAATTCACCTGGCCCCAGTA	21	59	108
			R: GGAGAACTCACCACATAGGG	20		
<i>B. bubalis</i>	CSN1S2	BUF13	F: CACCTGGCCCCAGTATCTCA	20	59	106
			R: AAAGGGAGAACTCACCACATAGG	23		
<i>B. bubalis</i>	CSN1S2	BUF14	F: AAATTCACCTGGCCCCAGTA	20	58	112
			R: AAAAGGGAGAACTCACCACATAGG	24		
<i>B. bubalis</i>	CSN2	BUF15	F: CGTGCTGTCCCTTTCTCAGT	20	59	262
			R: TCTCAGCTATGCTTATTTTGGAAAC	25		
<i>B. bubalis</i>	CSN2	BUF16	F: GTTCTGCCTGTTCCCCAGAA	20	58	235
<i>B. bubalis</i>	CSN2	BUF17	F: CCTGTTCCCCAGAAAGCAGT	20	58	154
			R: AACATCAGAAGTTAAACAGCACAG	24		
<i>B. bubalis</i>	CSN2	BUF18	F: AGAAAGCAGTGCCCTATCCC	20	58	221
			R: TCTCAGCTATGCTTATTTTGGAAAC	24		

Espécie	Nome do Gene	Primer	Sequência 5'-3'	Comp.	T°C	CP
<i>B. bubalis</i>	CSN3	BUF19	F: AGACCAACACAGCCCAAGTT	20	59	187
			R: AGCCCATTTTGCCTTCTCTGTA	22		
<i>B. bubalis</i>	CSN3	BUF20	F: AGCCCAAGTTACTTCAACCGT	21	58	178
			R: TAGCCCATTTTGCCTTCTCTG	21		
<i>B. bubalis</i>	CSN3	BUF21	F:AGACCAACACAGCCCAAGTTA	21	58	189
			R:TTAGCCCATTTTGCCTTCTCT	21		
<i>B. bubalis</i>	CSN3	BUF22	F: GACCAACACAGCCCAAGTTAC	21	59	189
			R: ATTAGCCCATTTTGCCTTCTCTG	23		
<i>B. bubalis</i>	CSN3	BUF23	F:ACAGAGAAGGCAAAATGGGCTA	22	58	204
			R:GTCTTTGTGTGTGAACAGGAGT	22		
<i>B. bubalis</i>	LALBA	BUF24	F: AGTCCTTTTCGTCCCAGCACT	20	60	266
			R: TGTGGGGCAGTGGTACAAAA	20		
<i>B. bubalis</i>	LALBA	BUF25	F:TCTCACCCAGAAGGCAACAG	20	60	264
			R: TGCTGGGACGAAAGGACTGA	20		
<i>B. bubalis</i>	LALBA	BUF26	F: TGCCAGAGTTCCTGGATGATG	21	60	145
			R: TGGGACGAAAGGACTGAGAAG	21		
<i>B. bubalis</i>	LALBA	BUF27	F: AGTCCTTTTCGTCCCAGCACTA	21	60	268
			R: ATTGTGGGGCAGTGGTACAAA	21		
<i>B. bubalis</i>	FABP4	BUF28	F: ATCCCCACAGAGCATCGTAA	20	59	246
			R: GCCAGAGTCAAACATAATCCC	22		
<i>B. bubalis</i>	FABP4	BUF29	F: ATCCCCACAGAGCATCGTAAA	21	59	125
			R: AGAAGATACTCACCAGCACCAT	22		
<i>B. bubalis</i>	FABP4	BUF30	F: ATTATCCCCACAGAGCATCGT	21	59	129
			R: GAGAAGATACTCACCAGCACCAT	23		
<i>B. bubalis</i>	LPL	BUF31	F:AGACAACCCTGACAGAAGCAT	21	60	266
			R: GTGAAGGGCAAAGCATGAGC	20		
<i>B. bubalis</i>	LPL	BUF32	F: GAAAGTCTGGCTGGTGAAGCAT	21	60	100
			R: AGTTCAGGGGTGAAGGGCAA	20		
<i>B. bubalis</i>	LPL	BUF33	F: TCCACAGGGTGATCTTCTGTTC	22	60	175
			R: TGAGCAGCATCCCTTGAGAGA	20		
<i>B. bubalis</i>	PPARL	BUF34	F: TCAGCGGGTGCACAGTAAT	20	59	254
			R: GAACGAGGCAGTCTTCACCA	20		
<i>B. bubalis</i>	PPARL	BUF35	F: ATGACCGACCGCTCAATCTC	20	59	147
			R: ACCTCACTGATGCCACGTTT	20		
<i>B. bubalis</i>	PPARL	BUF36	F: ATCAGAGGCCTGCGTCTCTA	20	60	105
			R: ACACGCATCACCAACAGAGT	20		
<i>B. bubalis</i>	PPARL	BUF37	F: CACGCATTTAGAAGGCGCAA	20	60	183
			R: TATGACGAGCACGGTCCCTA	20		
<i>B. bubalis</i>	SCD	BUF38	F: ACCTGGCTGGTGAATAGTGC	20	60	122
			R: TTGCTGTGGACTGCTGACTT	20		

Espécie	Nome do Gene	Primer	Sequência 5'-3'	Comp.	T°C	CP
<i>B. bubalis</i>	SCD	BUF39	F: GTCAGCAGTCCACAGCAAGA	20	60	262
			R: CAGCCCAAAGGGGTTTCATCA	20		
<i>B. bubalis</i>	DGAT	BUF40	F:CGCAGACACTTCTACAAGCC	20	60	104
			R:AGTGCCTGACCTCGTGGAA	20		

*Legenda: CP: Comprimento do produto de PCR em pares de base (Pb)

Fonte: Weiss (2021)

No melhoramento genético animal a herdabilidade mede o grau de correlação entre o genótipo e o fenótipo, sendo importante para a seleção de animais superiores para um programa de melhoramento genético (EUCLIDES *et al.*, 2009). Em bubalinos a herdabilidade é considerada moderada, apontando ser viável a seleção para ganho genético na espécie (ASPILCUETA-BORQUIS *et al.*, 2010). No entanto, para que isso seja possível, é necessário realizar o teste de progênie, um método caro com restrição de tempo (SENA *et al.*, 2012). Uma alternativa para solucionar esse problema é o desenvolvimento de marcadores moleculares que estejam associados a genes candidatos relacionados com a produção, sendo possível melhorar o ganho genético de uma característica de interesse ou várias simultaneamente (ARAUJO *et al.* 2015). O uso de marcadores moleculares que estão associados a dados zootécnicos de forma significativa evita ameaças às raças durante o controle de reprodução e aumenta a produção desses animais no Brasil (MARIANTE *et al.*, 2011).

O genoma completo de *B. bubalis* foi sequenciado recentemente no ano de 2018, e por esse motivo até então os pesquisadores utilizavam os marcadores moleculares de *B. taurus* para estudar as características dos bubalinos, o que não é o ideal, pois os genomas não são completamente iguais, principalmente para o estudo de genes candidatos, podendo apresentar falhas ou mutações que não estão presentes nos genes de bubalinos. Em comparação com *B. taurus* os búfalos possuem uma fusão no cromossomo 4 e 9, e poucos animais ainda possuem uma homologia conservada com a espécie (IANNUZZI *et al.*, 2003).

A criação de novos marcadores moleculares a partir do genoma de *B. bubalis* pode auxiliar no melhoramento genético da espécie e conseqüentemente aumentar a produção de leite e a qualidade de carne. Diante disso, o uso de marcadores moleculares aumenta a eficiência da seleção, já que tais marcadores podem

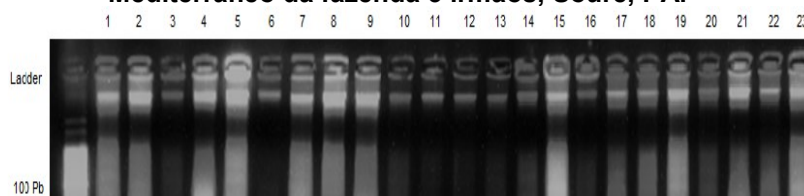
fornecer maior quantidade de informações e valores genéticos dos animais (ZETOUNI, 2013).

5.4 Validação dos marcadores moleculares em laboratório

5.4.1 Padronização da extração de DNA da espécie *B. bubalis*

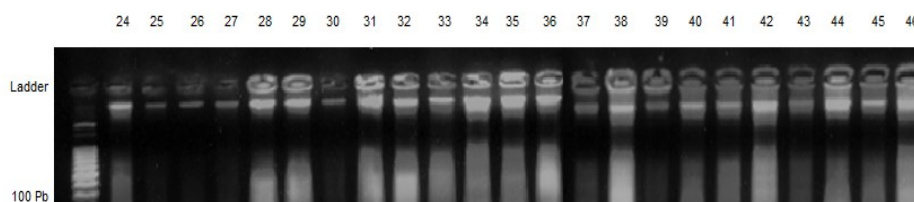
A partir da comparação visual do gel de agarose 1,2% pode-se perceber que o protocolo de extração de DNA para a espécie *B. bubalis* foi eficiente, onde apresentou poucas falhas (Fotografias 5 e 6). Conforme a intensidade das bandas de DNA das amostras dos genótipos é possível estimar que a concentração de DNA variou de 50 a 100 ng/ μ l. Resultados parecidos foram encontrados pelos autores Ribeiro *et al.* (2009), no qual realizaram seus estudos com a mesma espécie, usando um protocolo de extração de DNA similar ao que foi utilizado no presente trabalho, todas as extrações ocorreram com sucesso variado a concentração de DNA de 30 a 250 ng/ μ L.

Fotografia 5: Extração de DNA em gel 1,2% de agarose com as amostras de 1 a 23 da raça Mediterrâneo da fazenda 3 irmãos, Soure, PA.



Fonte: WEISS (2021)

Fotografia 6: Extração de DNA em gel 1,2% de agarose com as amostras de 24 a 46 da raça Murrah da fazenda Ditosa, Ipixuna do Pará, PA



Fonte: WEISS (2021)

5.4.2 Genotipagem dos primer desenvolvidos para genes candidatos

Para validar os primers em laboratório foram selecionados seis primers dos 40 que passaram em todos os testes, os parâmetros que foram utilizados para

escolha dos primers foi: Temperatura similar a 59°, não possuir harpins e dimeros. O primers foram projetados para os seguintes genes CSN1S1, CSN1S2, CSN2, CSN3, LPL e DGAT1 consecutivamente.

Para a padronização da PCR foi utilizado como referência o trabalho de Stafuzza *et al.* (2010), o qual desenvolveu um trabalho semelhante com bubalinos. Foi realizado um teste de gradiente para checar a melhor temperatura, sendo que a temperatura de 59°C foi a que apresentou os melhores resultados para o anelamento na região alvo de cada um dos primers. Após a padronização foram amplificados todos os primers.

Tabela 5: Primers que passaram em todos os testes e foram sintetizados e testados no laboratório

Espécie	Gene	Nome	Sequência 5'-3'	Comprimento	T°C	Comprimento Do Produto em Pb
<i>B. bubalis</i>	CSN1S1	BUF1	F: TCCACTAGGCACGCAATACC	20	59	138
			R: TGATAAGGCAACAATATGCAGTCA	24		
<i>B. bubalis</i>	CSN1S2	BUF8	F: TTCACCTGGCCCCAGTATCT	20	59	106
			R: AGGGAGAACTCACCACATAGG	21		
<i>B. bubalis</i>	CSN2	BUF18	F: AGAAAGCAGTGCCTATCCC	20	59	221
			R: TCTCAGCTATGCTTATTTTGGAAAC	24		
<i>B. bubalis</i>	FABP4	BUF28	F: AGCCCAAGTTACTTCAACCGT	21	59	246
			R: TAGCCCATTTTGCCTTCTCTG	21		
<i>B. bubalis</i>	LPL	BUF33	F: TCCACAGGGTGATCTTCTGTTC	22	59	175
			R: TGAGCAGCATCCCTTGGAGA	20		
<i>B. bubalis</i>	DGAT1	BUF40	F: CGCAGACACTTCTACAAGCC	20	59	104
			R: AGTGCACTGACCTCGTGGAA	20		

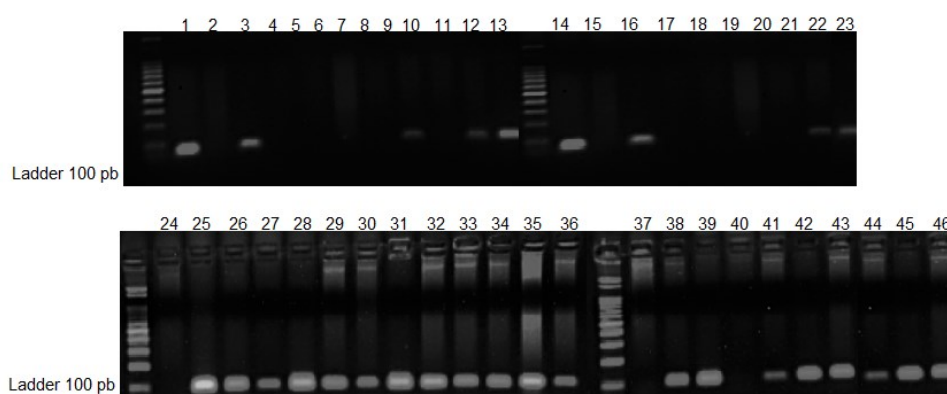
Fonte: WEISS (2021)

As imagens dos produtos amplificados em gel de agarose 2,8% (1,4% de agarose normal e 1,4% agarose Metaphor) seguem abaixo para o DNA dos 46 indivíduos, 23 da raça Mediterrâneo e 23 da raça Murrah (Fotografias 7, 8, 9, 10, 11 e 12). A maioria dos primers selecionados para os respectivos locus amplificaram, facilitando assim a análise dos resultados e permitindo uma maior acurácia na interpretação dos dados.

5.4.2 Genotipagem dos géis de PCR

O primeiro primer amplificado foi o Buf 01 do gene CSN1S1 (Fotografia 7). Foi possível observar que os genótipos de 1 a 23, que pertencem a raça Mediterrâneo, não apresentaram regiões amplificadas, enquanto, para os genótipos da raça Murrah o produto da amplificação variou de 135 pb até 150 pb, a qual apresentou três alelos diferentes (100 pb, 135 pb e 180 pb). O valor do PIC foi calculado com intuito de avaliar o grau de importância do loco, e também foi avaliado a quantidade de heterozigotos (H) na população, sendo atribuído os seguintes valores PIC:0,5803 e H: 0,6538.

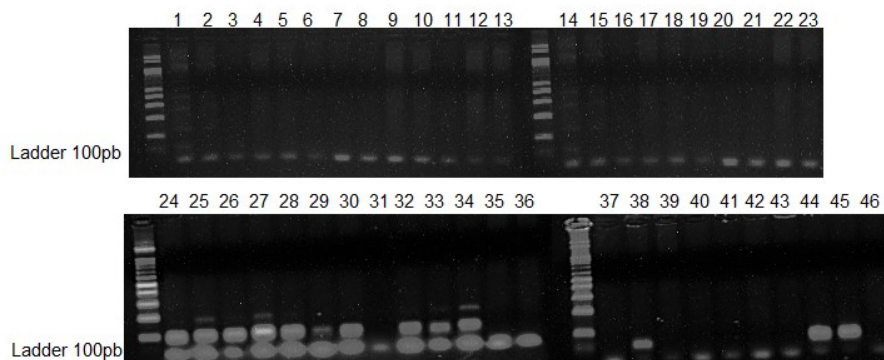
Fotografia 7: Genotipagem do primer Buf 01, do gene CSN1S1, sendo as amostras 1até 23 da raça Mediterrâneo e as amostras de 24 até 46 da raça Murrah.



Fonte: WEISS (2021)

O segundo primer testado foi o BUF8 do gene CSN1S2 (Fotografia 8). O qual apresentou um padrão parecido com o primeiro primer, não apresentando nenhum produto de PCR para a raça Mediterrâneo. Já as amostras raça Murrah os produtos de PCR variaram de 106 pb até 180 pb. Foram identificados três alelos diferentes (106 pb, 150 pb e 180 pb). Os valores de PIC e Heterozigosidade foram: PIC: 0,4744 e H: 0,5319.

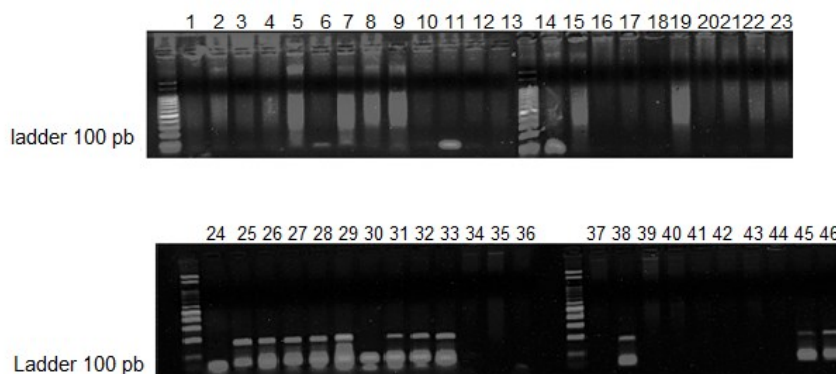
Fotografia 8: Genotipagem do primer Buf 08, do gene CSN1S2, sendo as amostras 1até 23 da raça Mediterrâneo e as amostras de 24 até 46 da raça Murrah.



Fonte: WEISS, E.C (2021)

O terceiro primer testado foi o BUF18 do gene CSN2 (Fotografia 09). Foi possível observar que para as amostras de 1 até 23 que pertencem a primeira raça não houve amplificação. Porém, para amostras da segunda raça foram identificados produtos de amplificação variando de 180 pb até 200 pb. Os valores de PIC e Heterozigotos foram: PIC: 0,318 e H: 0,3967.

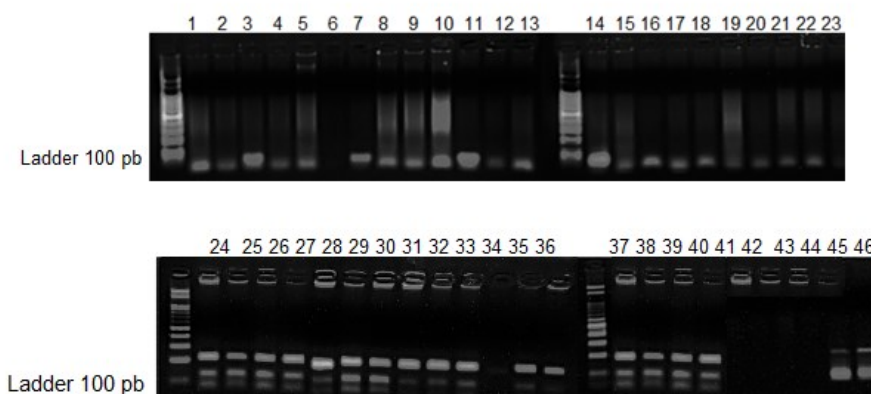
Fotografia 9: Genotipagem do primer Buf 18, do gene CSN2, sendo as amostras 1até 23 da raça Mediterrâneo e as amostras de 24 até 46 da raça Murrah.



Fonte: WEISS, E.C (2021)

O quarto testado foi o Buf20 do gene CSN3 (Fotografia 10). Assim, como nos outros primers não houve amplificação para as amostras da raça Mediterrâneo. Entretanto, para a raça Murrah quase todas as amostras amplificaram, e o produto de PCR variou de 160 pb até 204pb. Foram identificados três alelos diferentes (160 pb, 178pb e 200 pb). Os valores de PIC e Heterozigotos: PIC: 0,4818 e H: 0,5536.

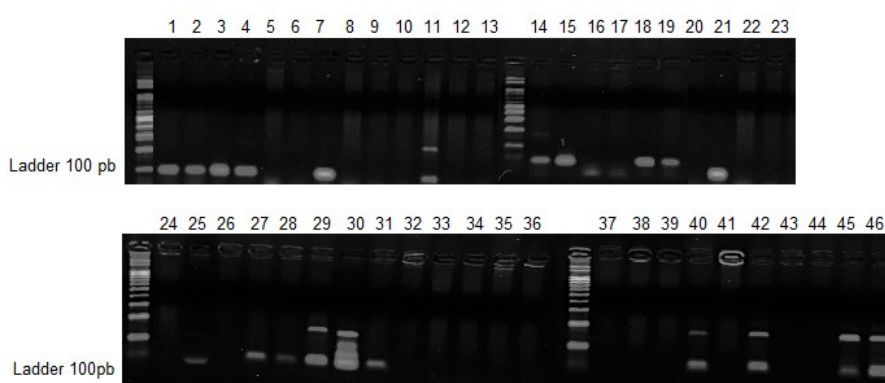
Fotografia 10: Genotipagem do primer Buf 20, do gene CSN3, sendo as amostras 1até 23 da raça Mediterrâneo e as amostras de 24 até 46 da raça Murrah.



Fonte: WEISS, E.C (2021)

O quinto primer testado foi o Buf 33 do gene LPL. Foi possível observar que para as amostras de 1 até 23 não houve produto amplificado, elas pertencem a primeira raça Mediterrâneo. Para as amostras da raça Murrah os produtos de amplificação variaram de 100 pb até 175 pb, sendo que, foram identificados três alelos diferentes (100 pb, 150 pb e 175 pb). Os valores de PIC e Heterozigotos foram: PIC: 0,5721 e H: 0,6446.

Fotografia 11: Genotipagem do primer Buf 33, do gene LPL, sendo as amostras 1até 23 da raça Mediterrâneo e as amostras de 24 até 46 da raça Murrah.

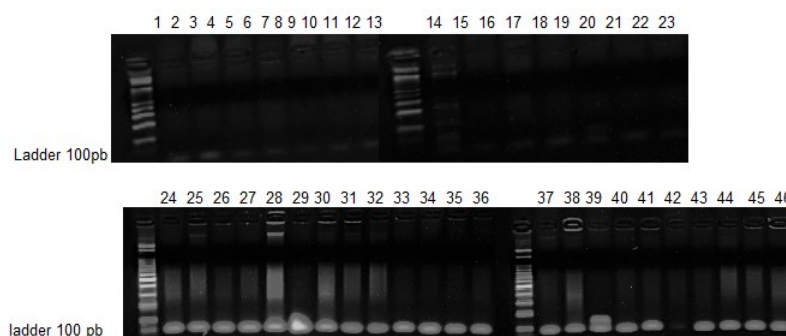


Fonte: WEISS, E.C (2021)

O sexto e último primer testado foi o Buf 40 do gene DGAT1 (Fotografia 12). Foi possível observar que para as amostras de 1 até 23 não foi possível detectar anelamento. Para as amostras da segunda raça Murrah os produtos de amplificação

variaram de 104 pb até 120 pb. Os valores de PIC e Heterozigotos foram: PIC= 0,3719 e H= 0,4938.

Fotografia 12: Genotipagem do primer Buf 40, do gene DGAT1 sendo as amostras 1até 23 da raça Mediterrâneo e as amostras de 24 até 46 da raça Murrah.



Fonte: WEISS (2021)

Com a análise dos resultados dos géis 2,8% agarose ($\frac{1}{2}$ Metaphor e $\frac{1}{2}$ LE Ludwing) foi possível constatar que os 6 primers foram eficientes e amplificaram para a raça Murrah, porém não foi possível encontrar um resultado satisfatório para as amostras da raça Mediterrâneo. Isso pode ter acontecido pela ausência desses genes na raça Mediterrâneo. Lacorte *et al.* (2006) explica que algumas raças de bubalinos não apresentam alguns polimorfismos, e este fato foi comprovado por meio do presente estudo.

Os loci obtidos para todos os primers variaram de 100 pb até 200pb, em média com dois alelos por primer. Os resultados obtidos, são semelhantes à de Marko *et al.* (2020), que utilizou marcadores moleculares do tipo SSR e identificou loci polimórficos do gene CSN2 em vacas da raça Holstein-Friesian, em média para cada primer foram obtidos três loci polimórficos e os produtos de PCR, variaram de 36pb até 250 pb. No entanto se diferem dos resultados encontrado por Mishra *et al.* (2009), que desenvolveu seu estudo com búfalos da raça Murrah, e identificou em média 5 loci para cada primer e Berthouly *et al.* (2010) que obteve 5,7 loci polimórficos com búfalos baios provenientes do Vietnã.

Até o presente momento não há relatos de trabalhos que utilizaram marcadores específicos para os genes candidatos relacionados com a característica de qualidade do leite em bubalinos, a maioria dos trabalhos encontrados na literatura são com marcadores moleculares do tipo SNP.

Tabela 6: Valores de PIC e Heterosigozidade (H) para os 6 primers desenvolvidos

Primers	Valores PIC	Valores H
BUF1	0,5803	0,6538
BUF8	0,4744	0,5319
BUF18	0,318	0,3967
BUF28	0,4818	0,5536
BUF33	0,5721	0,6446
BUF40	0,3719	0,4938

Fonte: WEISS (2021)

O valor de PIC obtidos na genotipagem (Tabela 6), foram moderadamente informativos para os primers dos genes CSN1S2, CSN2, CSN3 e DGAT1, com os respectivos valores 0,47; 0,31; 0,48; 0,37. Os demais primers para os genes (CSN1S1; LPL) tiveram alto conteúdo informativo (0,58; 0,57) consecutivamente. Segundo Xie *et al.* (2010) o valor do PIC é considerado pouco informativo de 0 a 25, moderadamente informativos de 0,25 até 0,5, e altamente informativo acima de 0,5. Siqueira *et al.* (2009) obteve os valores de PIC um pouco mais elevados que os que foram encontrados nesse estudo, para a raças angus (0,66; 0,64; 0,86; 0,64; 0,68) e para nelore (0,69; 0,60; 0,77; 0,68; 0,54).

A identificação de loci polimórficos para os genes candidatos relacionados com a produção de leite em bubalinos é importante, tendo em vista que os genes do cluster das caseínas e os genes LPL e DGAT1 são responsáveis pelas proteínas de maior abundância no leite, e são sem dúvida fontes de aminoácidos na dieta humana e, portanto, têm um impacto significativo na saúde dos consumidores de leite. Ademais, a identificação e caracterização do polimorfismo desses genes é uma etapa essencial para compreender a base genética de qualidade do leite em bubalinos. Ademais as informações obtidas podem ser úteis para os pecuaristas, auxiliando no melhoramento genético dos bubalinos.

6 CONCLUSÃO

A análise de enriquecimento de função e via dos genes CSN1S1, CSN1S2, CSN2, CSN3, LALBA, LPL, DGAT1, SCD e PPARG, foi eficiente e demonstrou a associação desses genes com processos biológicos complexos como a atividade lipídica, sintetização da lactose e regulação hormonal.

A rede de interação proteína-proteína para bubalinos não ficou completa sendo necessário construir outra rede para bovinos, a qual comprovou a interconexão entre os genes pesquisados, sendo que a principal associação ocorre entre as proteínas do cluster das caseínas.

Ademais, foi possível identificar e desenvolver marcadores moleculares específicos para os genes de forma eficiente através do programa Primer-BLAST. Os seis primers que foram sintetizados tiveram um bom desempenho na PCR *in silico* e na PCR convencional.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados apresentados no presente estudo fornecem bioinformação importantes, tendo em vista que o enriquecido dos caminhos e vias dos genes, apresentou uma nova perspectiva para a compreensão dos processos biológicos que estão envolvidos com a produção de leite em bubalinos. Ademais, com a segunda etapa da pesquisa foi apresentado 41 opções de primers que foram eficientes no teste *in silico*, e estão aptos para serem sintetizados em laboratório, e serem testados em novos estudos. Os primers específicos são uma alternativa mais barata para estudar os potenciais genes candidatos, se comparados com o chip SNP que possui um alto custo para genotipar rebanhos que possuem muitos animais.

Foi possível identificar loci polimórficos em todos os géis, e é necessário o sequenciamento dos produtos e o desenvolvimento de novos estudos para poder relacionar os polimorfismos encontrados com a característica de produção de leite em bubalinos.

REFERÊNCIAS

ABO-AL-ELA, Haitham G. *et al.* Association of a novel SNP in exon 10 of the IGF2 gene with growth traits in Egyptian water buffalo (*Bubalus bubalis*). **Tropical animal health and production**, v. 46, n. 6, p. 947-952, 2014.

ABCB. **Associação Brasileira de Criadores de Bubalinos**. Disponível em: <https://www.bufalo.com.br/home/>. Acesso em: 13/08/2020.

ARAÚJO, Daniele Neves *et al.* Polimorfismos nos genes da oxitocina e do receptor adrenérgico $\alpha 1a$ e seus efeitos nas características de produção em búfalas leiteiras. **Animal biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 165-168, 2015.

APRILE, Marianna *et al.* PPAR $\gamma\Delta 5$, a naturally occurring dominant-negative splice isoform, impairs PPAR γ function and adipocyte differentiation. **Cell reports**, v. 25, n. 6, p. 1577-1592, 2018.

ASPILCUETA-BORQUIS, RR *et al.* Parâmetros genéticos para características de produção e qualidade do leite de búfala usando inferência Bayesiana. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 5, p. 2195-2201, 2010.

BARROS, Camila *et al.* Uso de estudos de associação genômica em uma única etapa para a prospecção de regiões genômicas relacionadas à produção e qualidade do leite de bubalinos. **Journal of Dairy Research**, v. 85, n. 4, p. 402-406, 2018.

BERED, Fernanda; BARBOSA NETO, José Fernandes; CARVALHO, Fernando Irajá Félix de. Marcadores moleculares e sua aplicação no melhoramento genético de plantas. **Ciência Rural**, v. 27, p. 513-520, 1997.

BELLWOOD, Peter. First farmers: the origins of agricultural societies. **THESIS ABSTRACTS 63 BACKFILL**, p. 49, 2006.

BERNARDES, Otavio. Bubalinocultura no Brasil: situação e importância econômica. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 3, p. 293-298, 2007.

BERTHOULY, Cécile *et al.* Caracterização genética e morfométrica de uma população local vietnamita de búfalos do pântano. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 127, n. 1, p. 74-84, 2010.

BIBI, Faysal; VRBA, Elisabeth S. Unraveling bovin phylogeny: accomplishments and challenges. **BMC biology**, v. 8, n. 1, p. 50, 2010.

BITTENCOURT, J. V. M.; SEBBENN, A. M. Patterns of pollen and seed dispersal in a small, fragmented population of the wind-pollinated tree *Araucaria angustifolia* in southern Brazil. **Heredity**, v. 99, n. 6, p. 580, 2007.

BORQUIS, R. R. A. *et al.* Water buffalo genome characterization by the Illumina BovineHD BeadChip. **Genetics and Molecular Research**, p. 4202-4215, 2014.

CAETANO, Alexandre Rodrigues. Marcadores SNP: conceitos básicos, aplicações no manejo e no melhoramento animal e perspectivas para o futuro. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, p. 64-71, 2009.

CASES, Sylvaine *et al.* Identification of a gene encoding an acyl CoA: diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 22, p. 1301-1302, 1998.

CHEN, Dong *et al.* Expressão gênica relacionada à adipogênese, fibrogênese e miogênese no músculo longissimus de bovinos de corte de alta e baixa marmorização. **Ciência do gado**, v. 229, p. 188-193, 2019.

CHENG, Yunyun *et al.* Identification of four SNPs in LHB gene and their associations with sperm qualities of Chinese buffaloes. **Animal biotechnology**, v. 28, n. 3, p. 168-173, 2017.

COLLI, Licia *et al.* New insights on water buffalo genomic diversity and post-domestication migration routes from medium density SNP chip data. **Frontiers in genetics**, v. 9, p. 53, 2018.

COLEMAN, Rosalind A.; LEE, Douglas P. Enzymes of triacylglycerol síntese e sua regulação. **Progress in lipid research**, v. 43, n. 2, p. 134-176, 2004.

CAMARGO, G. M. F. *et al.* Prospecting major genes in dairy buffaloes. **BMC genomics**, v. 16, n. 1, p. 1-14, 2015.

CORVA, Pablo *et al.* Association of CAPN1 and CAST gene polymorphisms with meat tenderness in *Bos taurus* beef cattle from Argentina. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, n. 4, p. 1064-1069, 2007.

COSENZA, G. *et al.* Mediterranean river buffalo CSN1S1 gene: search for polymorphisms and association studies. **Animal Production Science**, v. 55, n. 5, p. 654-660, 2015.

CURAUDEAU, Manon; ROZZI, Roberto; HASSANIN, Alexandre. O genoma do anoa de várzea (*Bubalus depressicornis*) ilumina a origem do búfalo de rio e pântano. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 161, p. 1071, 2021.

DAYAL, S. *et al.* Genetic polymorphism of alpha-lactalbumin gene in riverine buffalo. **DNA Sequence**, v. 16, n. 3, p. 173-179, 2005.

DENG, Tingxian *et al.* Integrative analysis of transcriptome and GWAS data to identify the hub genes associated with milk yield trait in buffalo. **Frontiers in genetics**, v. 10, p. 36, 2019.

DENG, Tingxian *et al.* Four novel polymorphisms of buffalo INSIG2 gene are associated with milk production traits in Chinese buffaloes. **Molecular and cellular probes**, v. 30, n. 5, p. 294-299, 2016.

DENG, T. X. *et al.* Synonymous single nucleotide polymorphisms in the MC4R gene that are significantly associated with milk production traits in water buffaloes. **J. Gen. Mol. Res.**, v. 15, p. 1-8, 2016.

DENG, T. X. *et al.* Associations between polymorphisms of the STAT1 gene and milk production traits in water buffaloes. **Journal of animal science**, v. 94, n. 3, p. 927-935, 2016.

DENG, Tingxian *et al.* Buffalo SREBP1: molecular cloning, expression and association analysis with milk production traits. **Animal genetics**, v. 48, n. 6, p. 720-721, 2017.

DEVI, Indu *et al.* Valores limiares de características acústicas para avaliar as fases do ciclo estral em búfalas (*Bubalus bubalis*). **Applied Animal Behavior Science**, v. 219, p. 1048, 2019.

DEZFULI, B. Taheri *et al.* Economic weights of milk production traits for buffalo herds in southwestern Iran using the profit equation. **World Applied Sciences Journal**. v. 15, n. 11, p. 1604-1613, 2011.

DU, C. *et al.* Systematic analyses for candidate genes of milk production traits in water buffalo (*Bubalus Bubalis*). **Animal genetics**, v. 50, n. 3, p. 207-216, 2019.

DU, C. *et al.* Bioinformatics analysis of candidate genes for milk production traits in water buffalo (*Bubalus bubalis*). **Tropical animal health and production**, v. 52, n. 1, p. 63-69, 2020.

DUBEY, Divyanshu *et al.* Epidemiologia da encefalite auto-imune e comparação com encefalite infecciosa. **Annals of neurology**, v. 83, n. 1, p. 166-177, 2018.

EL-HALAWANY, Nermin *et al.* Genome-wide association study for milk production in Egyptian buffalo. **Livestock Science**, v. 198, p. 10-16, 2017.

EL-SHAZLY, Atef M. *et al.* Fasciolíase entre animais vivos e abatidos em nove centros da governadoria de Dakahlia. **Jornal da Sociedade Egípcia de Parasitologia**, v. 32, n. 1, p. 47-57, 2002.

EUCLIDES FILHO, K.; SILVA, L.O.C.; ALVES, R.G.O. *et al.* Tendência genética na raça Gir. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, p.787-791, 2000.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **The estate of food and agricultura**, 2009. Disponível em: <http://www.fao.org/brasil/pt/>

FREITAS, A. C. *et al.* Polymorphism in the A2M gene associated with high-quality milk in Murrah buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 2, 2016.

FITZPATRICK, Roberta Bronson. CIRRIE: An International Rehabilitation Resource. **Medical reference services quarterly**, v. 25, n. 4, p. 37-46, 2006.

GIL, F. M. M. *et al.* Polymorphisms in the ghrelin gene and their associations with milk yield and quality in water buffaloes. **Journal of dairy science**, v. 96, n. 5, p. 3326-3331, 2013.

HAUG, Anna; HØSTMARK, Arne T.; HARSTAD, Odd M. Bovine milk in human nutrition—a review. **Lipids in health and disease**, v. 6, n. 1, p. 1-16, 2007.

IAMARTINO, Daniela *et al.* Design and validation of a 90K SNP genotyping assay for the water buffalo (*Bubalus bubalis*). **PloS one**, v. 12, n. 10, p. 0185220, 2017.

IANNUZZI, Leopoldo. Um mapa físico genético em búfalos de rio (*Bubalus bubalis*, 2n = 50). **Caryologia**, v. 51, n. 3-4, pág. 311-318, 1998.

JUREK, Sandra *et al.* Otimizando a transdiferenciação adipogênica de células-tronco mesenquimais bovinas: Um papel proeminente do ácido ascórbico na indução de FABP4. **Adipócito**, v. 9, n. 1, p. 35-50, 2020.

KANISHT, T. C. *et al.* Investigations on wear behavior of Magnetic Field Assisted Abrasive Finished SS316L material. **Materials Today: Proceedings**, v. 5, n. 5, p. 12734-12743, 2018.

KIERSTEIN, Gerold *et al.* Analysis of mitochondrial D-loop region casts new light on domestic water buffalo (*Bubalus bubalis*) phylogeny. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 30, n. 2, p. 308-324, 2004.

KIRAN, M. *et al.* Efeito do envelhecimento nas propriedades físico-químicas e mudanças texturais em carnes desossadas quentes de búfalos de água indianos jovens e velhos (*Bubalus bubalis*). **Buffalo Bulletin**, v. 37, n. 2, p. 169-180, 2018.

KUMAR, Satish *et al.* Genetic variation and relationships among eight Indian riverine buffalo breeds. **Molecular ecology**, v. 15, n. 3, p. 593-600, 2006.

KUMAR, S. *et al.* As análises de DNA mitocondrial de búfalos de água indianos confirmam uma origem genética distinta de búfalos de rio e pântano. **Genética animal**, v. 38, n. 3, p. 227-232, 2007.

LACORTE, G. A. *et al.* DGAT1 K232A polymorphism in Brazilian cattle breeds. **Genet. Mol. Res**, v. 5, n. 3, p. 475-482, 2006.

LAU, C. H. *et al.* Genetic diversity of Asian water buffalo (*Bubalus bubalis*): mitochondrial DNA D-loop and cytochrome b sequence variation. **Animal Genetics**, v. 29, n. 4, p. 253-264, 1998.

LEE, Sunji *et al.* Cardiomyocyte regulation of systemic lipid metabolism by the apolipoprotein B-containing lipoproteins in *Drosophila*. **PLoS genetics**, v. 13, n. 1, p. 100-120, 2017.

LEI, C. Z. *et al.* Independent maternal origin of Chinese swamp buffalo (*Bubalus bubalis*). **Animal Genetics**, v. 38, n. 2, p. 97-102, 2007.

LI, Jun *et al.* An association analysis between PRL genotype and milk production traits in Italian Mediterranean river buffalo. **The Journal of dairy research**, v. 84, n. 4, p. 430, 2017.

LINCH, M.; WALSH, B. **Genetics and analysis of quantitative traits**. Sunderland: Sinauer Associates, 1998. 980p.

LIU, J. J. *et al.* Genome-wide association studies to identify quantitative trait loci affecting milk production traits in water buffalo. **Journal of dairy science**, v. 101, n. 1, p. 433-444, 2018.

MACGREGOR, R. O búfalo doméstico. **Veterinary Record**, v. 53, p. 443-450, 1941.

MARCONDES, C. R.; MARQUES, JRF; CUNHA, BR do No. Melhoramento genético em bubalinos. In: **Embrapa Amazônia Oriental-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: ENCONTRO INTERNACIONAL DA PECUÁRIA DA AMAZÔNIA, 1., 2008, Belém, PA. Meio ambiente e pecuária:[anais]. Belém, PA: FAEPA; Instituto Frutal; SEBRAE-PA, 2008. 1 CD-ROM., 2007.

MARYAM, J. *et al.* A novel selection signature in stearoyl-coenzyme A desaturase (SCD) gene for enhanced milk fat content in *Bubalus bubalis*. **Tropical animal health and production**, v. 48, n. 7, p. 1343-1349, 2016.

MEI, Chu-Gang *et al.* Polimorfismos em genes de receptores adrenérgicos em gado Qinchuan mostram associações com características de carcaça selecionadas. **Ciência da carne**, v. 135, p. 166-173, 2018.

MICHELIZZI, Vanessa N. *et al.* Water buffalo genome science comes of age. **International journal of biological sciences**, v. 6, n. 4, p. 333, 2010.

MISHRA, Shailendra Kumar *et al.* Diversity analysis at MHC class II DQA locus in buffalo (*Bubalus bubalis*) indicates extensive duplication and trans-species evolution. **Genomics**, v. 112, n. 6, p. 4417-4426, 2020.

MOHAMED, Amr M. *et al.* Avaliação do ensaio imunoenzimático indireto TaSP para o diagnóstico de teileriose tropical em bovinos (*Bos indicus*) e búfalos (*Bubalus bubalis*) no Egito. **Parasitologia veterinária**, v. 186, n. 3-4, p. 486-489, 2012.

NAFIU, L. O. *et al.* Response of selected heifer buffalo to feed improvement in Bombana Regency Indonesia. **Pak. J. Nutr**, v. 17, n. 12, p. 683-688, 2018.

NASCIMENTO, C. N. B.; CARVALHO, LOD de M.; BARBOSA, Wilson Carvalho. Valor nutritivo da carne de búfalos Murrah. **Embrapa Amazônia Oriental-Séries anteriores (INFOTECA-E)**, 1993.

PAUL, Shyam Sunder; LAL, Dalip. **Nutrient requirements of buffaloes**. New Delhi: Satish Serial Publishing House, 2010.

PEREIRA, Emílio César Martins. **Produção de oócitos e embriões bubalinos: efeitos da época do ano e da adição de óleo essencial de Lippia organoides na maturação in vitro**. 2012.

RAMALHO, M.A.P.; SANTOS, J.B.; PINTO, C.A.B.P. **Genética na agropecuária**. 5. ed. Lavras: UFLA, 2012.

RAMOS, ALCIDES AMORIM *et al.* Critérios de seleção (GND E D160) para velocidade de crescimento em bubalinos de corte. **Embrapa Meio-Norte-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2005.

ROSA, A. do N.; MENEZES, GR de O.; DO EGITO, Andréa Alves. Recursos genéticos e estratégias de melhoramento. **Embrapa Gado de Corte-Capítulo em livro científico (ALICE)**, 2013.

SEBBENN, A. M. *et al.* Low levels of realized seed and pollen gene flow and strong spatial genetic structure in a small, isolated and fragmented population of the tropical tree *Copaifera langsdorffii* Desf. **Heredity**, v. 106, n. 1, p. 134, 2011.

SENA, Thomaz Marques. **Estimação de parâmetros genéticos e avaliação do progresso genético e fenotípico de características de produção e de qualidade de leite em bubalinos leiteiros**. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento Animal). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. São Paulo. p. 33. 2019.

SHARMA, Isha; SINGH, Dheer. Conjugated linoleic acids attenuate FSH-and IGF1-stimulated cell proliferation; IGF1, GATA4, and aromatase expression; and estradiol-17 β production in buffalo granulosa cells involving PPAR γ , PTEN, and PI3K/Akt. **Reproduction**, v. 144, n. 3, p. 373-383, 2012.

SHI, D.-S. *et al.* DGAT1, GH, GHR, PRL and PRLR polymorphism in water buffalo (*Bubalus bubalis*). **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. 2, p. 328-334, 2012.

SIQUEIRA, Jeanne B.; GUIMARÃES, José D.; PINHO, Rogério O. Relação entre perímetro escrotal e características produtivas e reprodutivas em bovinos de corte: uma revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 37, n. 1, p. 3-13, 2013.

STAFUZZA, Nedenia Bonvino. **Construção de uma biblioteca BAC e avaliação de marcadores para caracterização de regiões alvo do genoma do búfalo**. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento Animal). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. São Paulo. p. 142. 2010.

STELLA, Aline Aparecida Silva *et al.* Expression profile of the CSF3 and LPO genes in milk from buffalo (*Bubalus bubalis*) with and without mastitis. **Molecular and cellular probes**, v. 41, p. 39-42, 2018.

SINGH, B. *et al.* The domesticated buffalo - An emerging model for experimental and therapeutic use of extraembryonic tissues. **Theriogenology**, v. 151, p. 95–102, 2020.

SUKLA, Soumi *et al.* Cloning and characterization of α 2-casein gene of Riverine buffalo: Full Length Research Paper. **DNA Sequence**, v. 17, n. 6, p. 458-464, 2006.

TIZIOTO, Polyana Cristine *et al.* Conteúdo de cálcio e potássio na carne bovina: Influências na maciez e associações com marcadores moleculares em bovinos Nelore. **Ciência da carne**, v. 96, n. 1, p. 436-440, 2014.

VENKATACHALAPATHY, R.; HARINI, L. Cenomanian planktic foraminiferal biostratigraphy of Southern India and their correlation. **Journal of the Palaeontological Society of India**, v. 64, n. 1, p. 107-114, 2019.

VENTURINI, G. C. *et al.* Association between single-nucleotide polymorphisms and milk production traits in buffalo. **Genet Mol Res**, v. 13, n. 4, p. 102-120, 2014.

WILLIAMS, John L. *et al.* Genome assembly and transcriptome resource for river buffalo, *Bubalus bubalis* (2 n= 50). **Gigascience**, v. 6, n. 10, p. 88, 2017.

XIE, B. *et al.* Cultura in vitro e diferenciação de espermatogônias de bubalinos (*Bubalus bubalis*). **Reprodução em animais domésticos**, v. 45, n. 2, pág. 275-282, 2010.

WU, Jun Jing *et al.* Investigation of transferability of BovineSNP50 BeadChip from cattle to water buffalo for genome wide association study. **Molecular biology reports**, v. 40, n. 2, p. 743-750, 2013.

YINDEE, M. *et al.* Y-chromosomal variation confirms independent domestications of swamp and river buffalo. **Animal genetics**, v. 41, n. 4, p. 433-435, 2010.

ZETONI, Larissa *et al.* Polymorphisms in the MTRN1A gene and their effects on the productive and reproductive traits in buffaloes. **Tropical animal health and production**, v. 46, n. 2, p. 337-340, 2014.

ZHANG, Yi. Strong and stable geographic differentiation of swamp buffalo maternal and paternal lineages indicates domestication in the China/Indochina border region. **Molecular ecology**, v. 25, n. 7, p. 1530-1550, 2016.

ZHANG, Y.; COLLI, L.; BARKER, J. S. F. Asian water buffalo: domestication, history and genetics. **Animal Genetics**, v. 51, n. 2, p. 177–191, 2020.

ZICARELLI, L. Leite de búfala: propriedades, produção leiteira e produção de mussarela. **Comunicações de pesquisa veterinária**, v. 28, p. 127, 2004.

ZHOU, Shiguo *et al.* A clone-free, single molecule map of the domestic cow (*Bos taurus*) genome. **BMC genomics**, v. 16, n. 1, p. 1-19, 2015.

ANEXO A - Tutorial das análises de bioinformática

TUTORIAL PARA O DESENVOLVIMENTO DE PRIMERS

Para esse estudo foram selecionados através de pesquisas bibliográfica 10 genes candidatos a produção de leite em bubalinos (Tabela 1).

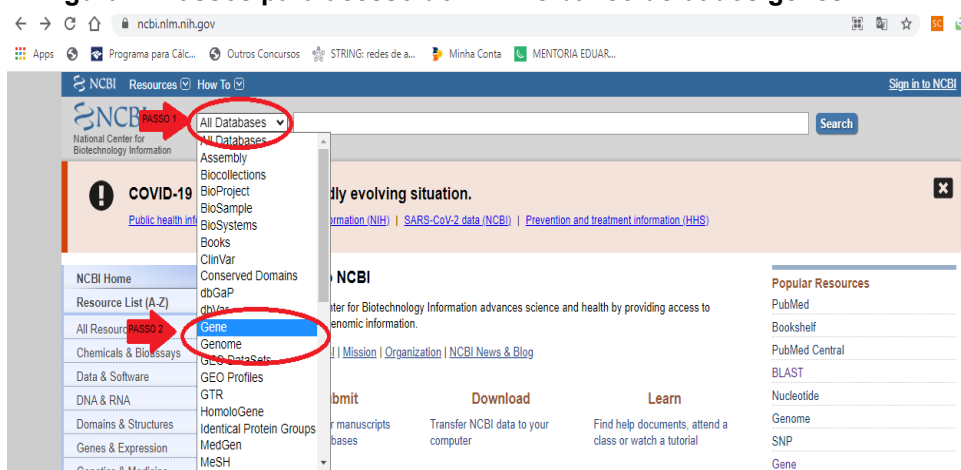
Tabela 1: Genes candidatos para produção de leite em bubalinos

Gene	Função	ID: gene	Sequência	Chs	Localização
CSN1S1	Leite	102396531	NC_037551.1	7	32146994-32164041
CSN1S2	Leite	102395699	NC_037551.1	7	32020707-32039442
CSN2	Leite	102396229	NC_037551.1	7	32118803-32127683
CSN3	Leite	102395364	NC_037551.1	7	31914822-31928057
LALBA	Leite	102410146	NC_037548.1	4	89111526-89113254
FABP4	Leite	102410448	NC_037559.1	15	37653377-37657605
LPL	Leite	102412415	NC_037547.1	3	129634963-129659186
PPARG	Leite	102399331	NC_037565.1	21	56707623-56924900
SCD	Leite	102401664	NC_037567.1	23	21067064-21082233
DGAT1	Leite	102390126	NC_037559.1	15	81682793-81693016

Fonte: WEISS (2021)

Após a seleção dos genes, foi utilizado o banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) o qual foi acessado através do site (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Para iniciar as pesquisas vá na opção e clique em “*All database*” (passo 1) e escolha o banco de dados Gene (passo 2) (Figura 1).

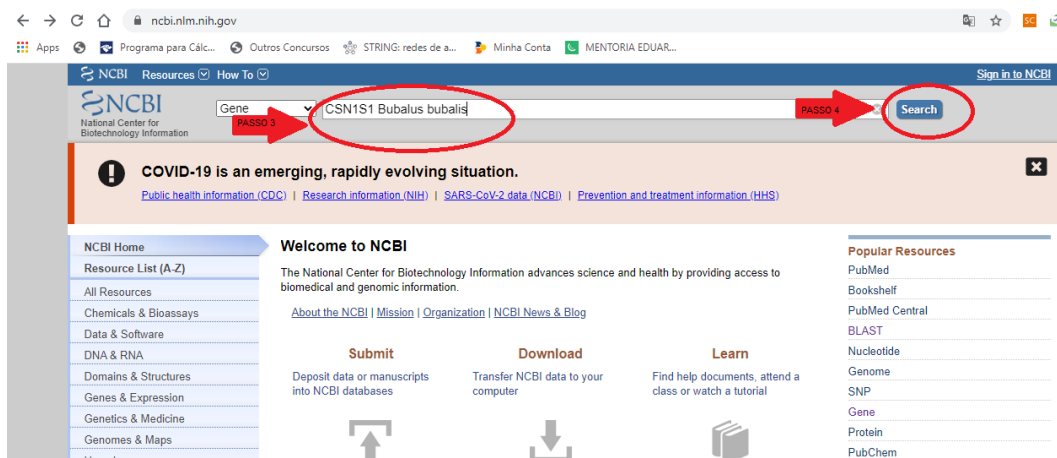
Figura 1: Passos para acesso do NCBI e banco de dados genes



Fonte: NCBI (2021) adaptado por WEISS (2021).

Em seguida no espaço destinado a pesquisa coloque o nome do gene, mais o nome científico da espécie que você procura, ex. CSN1S1 Bubalus bubalis (passo 3) e em seguida clicar na opção “*Search*” (passo 4) conforme (Figura 2).

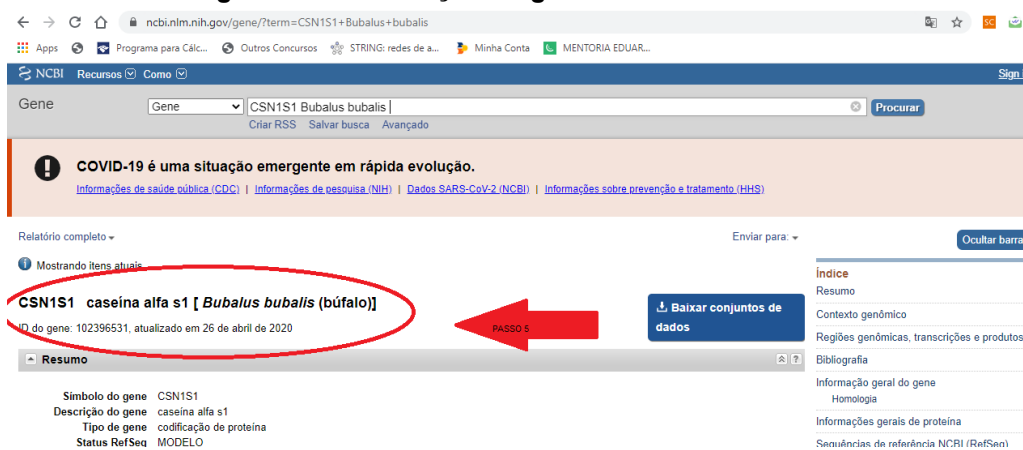
Figura 1: Pesquisa do gene mais o nome do animal



Fonte: NCBI (2021) adaptado por WEISS (2021).

Será aberto uma nova janela com as informações do gene que foi pesquisado (Figura 3), nesse passo é importante conferir se as informações são do gene que você deseja pesquisar e se corresponde a espécie desejada (passo 5). Se acaso houver mais de uma sequência desse gene no banco de dados pode aparecer uma nova janela com as opções, sempre clique no primeiro gene.

Figura 3: Identificação do gene no banco de dados



Fonte: NCBI (2021) adaptado por WEISS (2021).

Em seguida vá até o final da página até encontrar o item **“Genomic regions, transcripts, and products”** (passo 6) onde aparecerá um gráfico de anotação genômica do gene contendo informações da localização e a quantidade de introns e

exons presente (Figura 4). Acima do gráfico está escrito “Go to nucleotide” (passo 7) clique na opção “FASTA” (passo 8).

Figura 4: Encontrando a sequência FASTA

The screenshot shows the NCBI Gene database interface for the gene NC_037551.1. The main content area displays genomic regions, transcripts, and products. A red circle highlights the 'FASTA' link in the 'Go to nucleotide' menu. Red arrows indicate the steps: PASSO 6 points to the 'Genomic regions, transcripts, and products' tab, PASSO 7 points to the 'Go to nucleotide' link, and PASSO 8 points to the 'FASTA' option.

Fonte: NCBI (2021) adaptado por WEISS (2021).

Na sequência irá abrir uma nova janela (Figura 5) com a sequência FASTA do gene, no canto direito da tela clique na opção “Send to:” (passo 9) e abrirá uma caixa com as opções para baixar a sequência, então selecione “Complete Record” (passo 10), “File” (passo 11) e “Format FASTA” (passo 12) e por fim clique na opção “Create file” (passo 13).

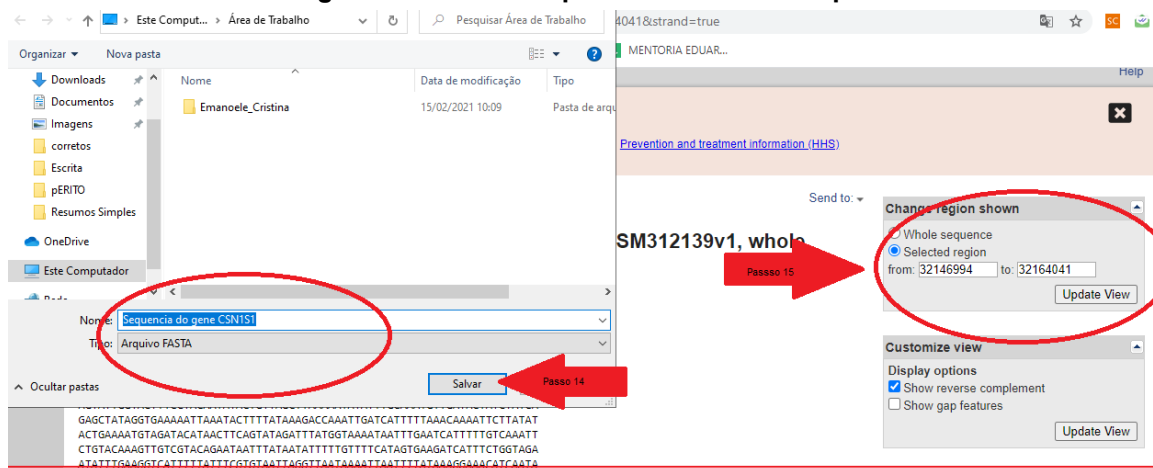
Figura 5: Baixar a sequência FASTA

The screenshot shows the NCBI Gene database interface for the gene NC_037551.1. The main content area displays the FASTA sequence. A red circle highlights the 'Send to:' dropdown menu. Red arrows indicate the steps: PASSO 9 points to the 'Send to:' dropdown, PASSO 10 points to the 'Complete Record' option, PASSO 11 points to the 'File' option, PASSO 12 points to the 'Format FASTA' option, and PASSO 13 points to the 'Create File' option.

Fonte: NCBI (2021) adaptado por WEISS (2021).

A sequência será baixada em seu computador (passo 14), é importante que você crie uma pasta para que as sequências fiquem organizadas para que seja mais fácil de localizar no seu computador para as próximas análises (Figura 6). Na mesma página é possível identificar a localização do gene dentro do cromossomo (passo 15).

Figura 6: Salvar a sequência Fasta no computador



Fonte: NCBI (2021) adaptado por WEISS (2021).

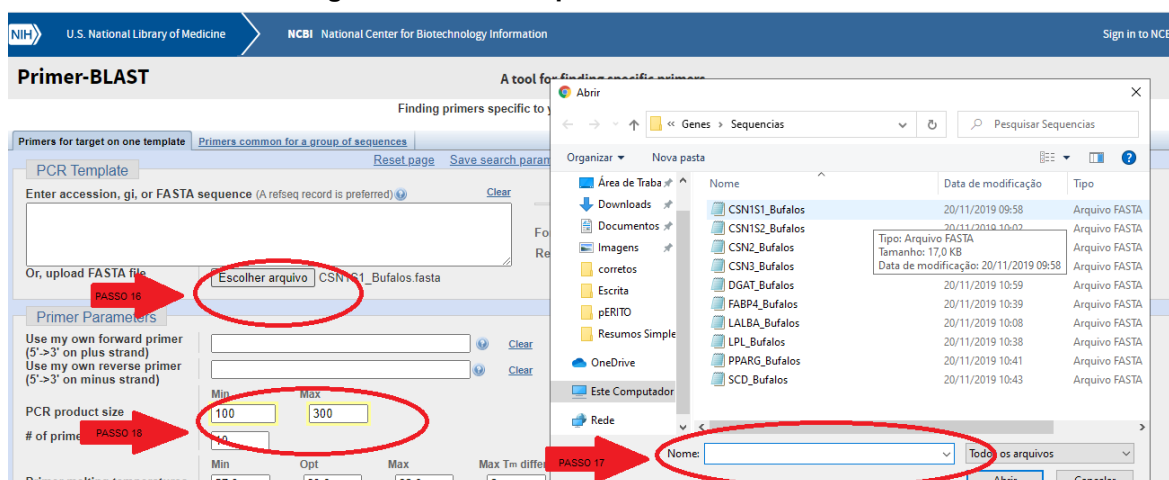
Após ter realizado o download da sequência do gene de interesse, pode-se dar continuidade às análises utilizando outros softwares. Nós prosseguiremos nossas análises utilizando a ferramenta de desenho de primers do NCBI o Primer-Blast, disponível no site (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), o qual permite desenhar primers específicos para genes (Figura 7).

Figura 7: Ferramenta Primer-BLAST

Fonte: NCBI (2021) adaptado por WEISS (2021).

No Primer-Blast vá na opção “**escolher arquivo**” (passo 16) e irá abrir uma nova janela para procurar o arquivo em seu computador (passo 17), escolha a sequência do gene que foi realizado o download, na sequência clique na opção “**Primer parameters**” mude o item “**PCR product size**” onde estava Min (70) Max (1000) mude para Min (100) Max (300) para que não tenha produtos de PCR nem muito grandes e nem muito pequenos (passo 18) (Figura 8).

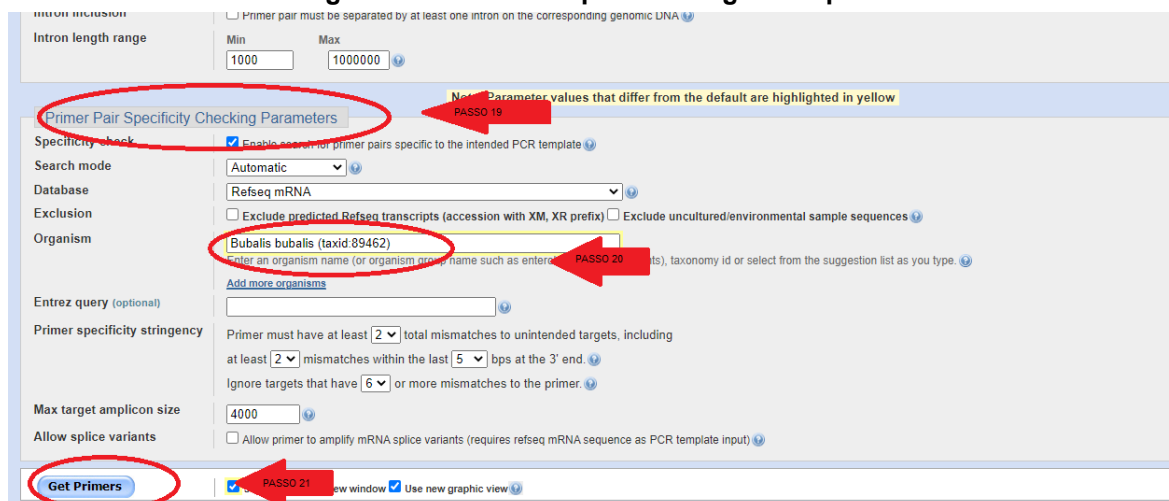
Figura 8: Abrir a sequência fasta no Primer-Blast



Fonte: NCBI (2021) adaptado por WEISS (2021).

Em seguida vá até o final da página até a opção “**Primer Pair Specificity Checking Parameters**” (passo 19) e mude o organismo para a espécie pesquisada, ex. *Bubalus bubalis* (passo 20), por fim clique em “**Get Primers**” (passo 21) (Figura 9).

Figura 9: Paramentos para o designer de primers



Fonte: NCBI (2021) adaptado por WEISS (2021).

Em seguida abra uma nova janela (Figura 10) com um gráfico da localização dos primers dentro do cromossomo da espécie pesquisada, rolando a página é possível perceber os primers que foram gerados pelo programa (Figura 11), é possível identificar várias informações como: Forward e Reverse, quantidade de pares de base, temperatura de anelamento e quantidade guanina e citosina.

Figura 10: Gráfico da localização dos primers



Fonte: NCBI (2021) adaptado por WEISS (2021).

Figura 11: Primer que foram desenhados

Detailed primer reports

Primer pair 1		Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer		TCCACTAGGCACGCAATACC	Plus	20	15084	15103	59.82	55.00	0.00	0.00
Reverse primer		TGATAAGGCAACAATATGCAGTCA	Minus	24	15221	15198	58.81	37.50	4.00	1.00
Product length		138								
Primer pair 2		Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer		ACTAGGCACGCAATACCCTG	Plus	20	15087	15106	59.82	55.00	4.00	2.00
Reverse primer		AAGGCAACAATATGCAGTCATT	Minus	23	15217	15195	57.59	34.78	4.00	3.00
Product length		131								
Primer pair 3		Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer		TGACTGCATATTGTCCTTATCA	Plus	24	15198	15221	58.81	37.50	4.00	2.00
Reverse primer		GCACTGCTCCACATGTTCTCT	Minus	20	15383	15364	60.61	55.00	6.00	0.00
Product length		186								
Primer pair 4		Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer		CACTAGGCACGCAATACCCT	Plus	20	15086	15105	59.82	55.00	4.00	0.00
Reverse primer		TTGATAAGGCAACAATATGCAGTCA	Minus	25	15222	15198	59.35	36.00	4.00	1.00
Product length		137								
Primer pair 5		Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity

Fonte: NCBI (2021) adaptado por WEISS (2021).

Após o desenho dos primers é necessário construir uma tabela no Excel com as principais informações dos primers, pois o programa Primer-Blast não deixa baixar as sequências de primers para o computador, em exemplo (Tabela 2).

Tabela 2: Tabela com os primers como exemplo

Espécie	Nome	Sequência 5'-3'	PB	Start	Stop	CP
Bubalus bubalis	Primer1	F: TCACGCGGGTTGCACAGTAAT	20	4333	4352	254
		R: GAACGAGGCAGTCTTCACCA	20	4586	4567	
Bubalus bubalis	Primer2	F: GGGACCGTGCTCGTCATAAA	20	3349	3368	299
		R: CCAGTTGGCCTCTGTAGGTG	20	3647	3628	
Bubalus bubalis	Primer3	F: GGTGCTTTTCAGACTGGGGA	20	9765	9784	104
		R: GGGCTGTGTTCCGTCACCTTA	20	9868	9849	
Bubalus bubalis	Primer4	F: ATGACCGACCGCTCAATCTC	20	1080	1099	147
		R: ACCTCACTGATGCCACGTTT	20	1226	1207	
		R: GCCTTTTTAGCAGGCGGAAC	20	6966	6947	

Legenda: PB (Pares de bases); CP (comprimento do produto de PCR).

Fonte: WEISS (2021).

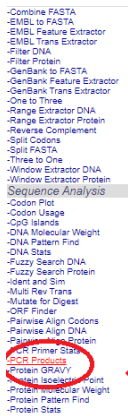
Depois de identificar a sequência do gene e desenhar os primers faremos as análises para testar os primers *in silico*. O primeiro programa que utilizaremos é o SMS- *Sequence Manipulation Suite: Version 2* disponível no site (<https://www.bioinformatics.org/sms2/>).

Figura 12: SMS- Sequence Manipulation Suite: Version 2

Fonte: SMS (2021) adaptado por WEISS (2021).

No canto esquerdo procure a opção “ PCR Products ” e clique em cima (Figura 13) e aparecerá uma nova janela com a ferramenta para verificar o produto de PCR de cada primer (Figura 14).

Figura 13: Item PCR products



- Combine FASTA
- EMBL to FASTA
- EMBL Feature Extractor
- EMBL Trans Extractor
- Filter DNA
- Filter Protein
- GenBank to FASTA
- GenBank Feature Extractor
- GenBank Trans Extractor
- One to Three
- Range Extractor DNA
- Range Extractor Protein
- Reverse Complement
- Split Codons
- Split FASTA
- Three to One
- Window Extractor DNA
- Window Extractor Protein
- Sequence Analysis
- Codon Plot
- Codon Usage
- CoG Islands
- DNA Molecular Weight
- DNA Pattern Find
- DNA Stats
- Fuzzy Search DNA
- Fuzzy Search Protein
- Ident and Sim
- Multi Rev Trans
- Mutate for Digest
- ORF Finder
- Pairwise Align Codons
- Pairwise Align DNA
- Pairwise Align Protein
- PCR Primer Stats
- PCR Products**
- Protein GRAVY
- Protein Isoelectric Point
- Protein Molecular Weight
- Protein Pattern Find
- Protein Stats
- Restriction Digest

Sun 14 Jun 00:36:59 2020
Valid XHTML 1.0, Valid CSS

new window | home | citation

• The Sequence Manipulation Suite is a collection of JavaScript programs for generating, formatting, and analyzing short DNA and protein sequences. It is commonly used molecular biologists, for teaching, and for program and algorithm testing.

• See the about the Sequence Manipulation Suite page for more information about individual Sequence Manipulation Suite programs.

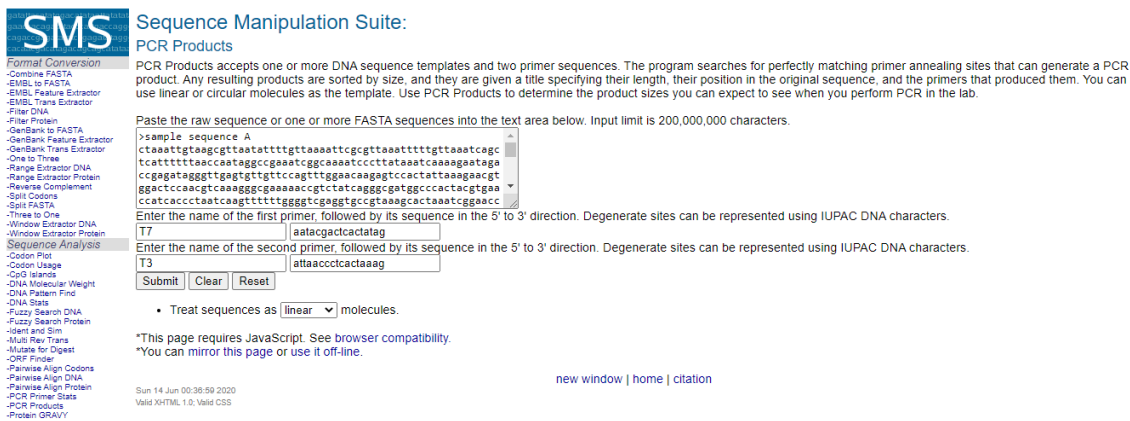
• You can easily mirror the Sequence Manipulation Suite on your own web site, or you can use it off-line.

• This version of the Sequence Manipulation Suite represents a complete re-write of the previous version. The new version is much faster and has many new features. The previous version of the Sequence Manipulation Suite can still be accessed.

• Send questions and comments to stohard@ualberta.ca.

Fonte: SMS (2021) adaptado por WEISS (2021).

Figura 14: Ferramenta para gerar os produtos de PCR



SMS Sequence Manipulation Suite:
PCR Products

Formal Conversion

PCR Products accepts one or more DNA sequence templates and two primer sequences. The program searches for perfectly matching primer annealing sites that can generate a PCR product. Any resulting products are sorted by size, and they are given a title specifying their length, their position in the original sequence, and the primers that produced them. You can use linear or circular molecules as the template. Use PCR Products to determine the product sizes you can expect to see when you perform PCR in the lab.

Paste the raw sequence or one or more FASTA sequences into the text area below. Input limit is 200,000,000 characters.

```
>sample sequence A
ctaaattgtaagcgttaaatattttgtaaaattcgcgttaaatattttgtaaatcagc
tcatttttaaccaataggccgaatcggcaaatccctataaatcaaaagataga
ccgagatagggttagtgtttccagtttggaacaagagtcacattataaagaactg
ggactccaacgtcaaggcgaaaaacgctctcaggcgatggcccaactagtgaa
ccatcaccttaacagttttggagtcgaggtgcgtaagcactaaatcgaacc
```

Enter the name of the first primer, followed by its sequence in the 5' to 3' direction. Degenerate sites can be represented using IUPAC DNA characters.

T7 | ataacgactcactatag

Enter the name of the second primer, followed by its sequence in the 5' to 3' direction. Degenerate sites can be represented using IUPAC DNA characters.

T3 | ataacctcactaaga

Submit Clear Reset

- Treat sequences as molecules.

*This page requires JavaScript. See browser compatibility.
*You can mirror this page or use it off-line.

Sun 14 Jun 00:36:59 2020
Valid XHTML 1.0, Valid CSS

new window | home | citation

Fonte: SMS (2021) adaptado por WEISS (2021).

Conforme a (Figura 15) coloque no quadro a sequência do gene (passo 23) e no passo 24 coloque a sequência dos primers que foi obtida no programa Primer-Blast e por fim clique na opção “ **Submit** ” (passo 25).

Figura 15: Passo a passo para usar o programa SMS PCR products.

SMS Sequence Manipulation Suite:
PCR Products

PCR Products accepts one or more DNA sequence templates and two primer sequences. The program searches for perfectly matching primer annealing sites that can be represented using IUPAC DNA characters. You can expect to see when you perform PCR in the lab.

Paste the raw sequence or one or more FASTA sequences into the text area below. Input limit is 200,000,000 characters.

Enter the name of the first primer, followed by its sequence in the 5' to 3' direction. Degenerate sites can be represented using IUPAC DNA characters.

Enter the name of the second primer, followed by its sequence in the 5' to 3' direction. Degenerate sites can be represented using IUPAC DNA characters.

Treat sequences as linear molecules.

*This page requires JavaScript. See browser compatibility.
*You can mirror this page or use it off-line.

Sun 14 Jun 00:38:59 2020
Valid XHTML 1.0, Valid CSS

new window | home | citation

Passo 23: Indica a área de texto onde a sequência de DNA deve ser colada.

Passo 24: Indica os campos de entrada para o nome e a sequência do primeiro e segundo primers.

Passo 25: Indica o botão "Submit" para executar o processo.

Fonte: SMS (2021) adaptado por WEISS (2021).

Vai abrir uma nova janela (Figura 16) com o produto de PCR obtido pelo primer que foi colocado. Repetir esse processo com todos os primers e conferir se é o mesmo produto de PCR que deu no programa Primer-Blast.

Figura 16: Produto de PCR obtido do par de primers

Sequence Manipulation Suite - Google Chrome

about:blank

PCR Products results

>138 bp product from linear template NC_037551.1:c32164041-32146994 Bubalus bubalis breed Me

TCACCTAGGCACGCAATACCOCTGATGCCOCATTATCTCTGACATCCOCTAATCCOCATCG
CTCTGAGACAGTGGAAAGACTACTATGOCACGTGGTGGTAAAGTTCATTTAAATGACTG
CATATTGTTGCOCTTATCA

Treat sequences as linear molecules.

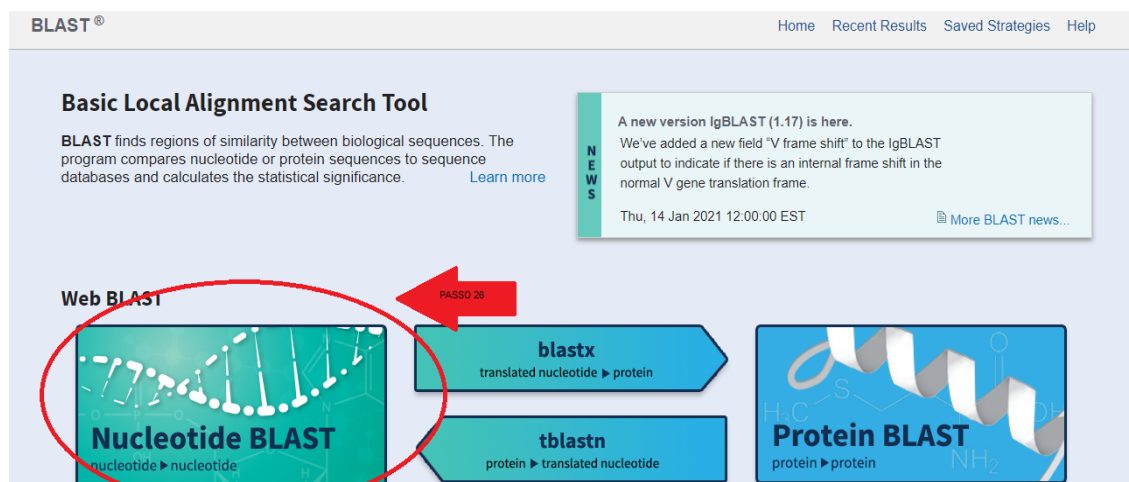
*This page requires JavaScript. See browser compatibility.
*You can mirror this page or use it off-line.

new window | home | citation

Fonte: SMS (2021) adaptado por WEISS (2021).

Na sequência foi realizada a pesquisa no BLASTn que é uma ferramenta onde se encontra regiões de similaridade entre as sequências biológicas. O endereço eletrônico de acesso ao BLASTn é (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Na página do BLASTn (figura 17) clica-se no retângulo escrito “**Nucleotide BLAST**” (passo 26) que direciona a próxima tela.

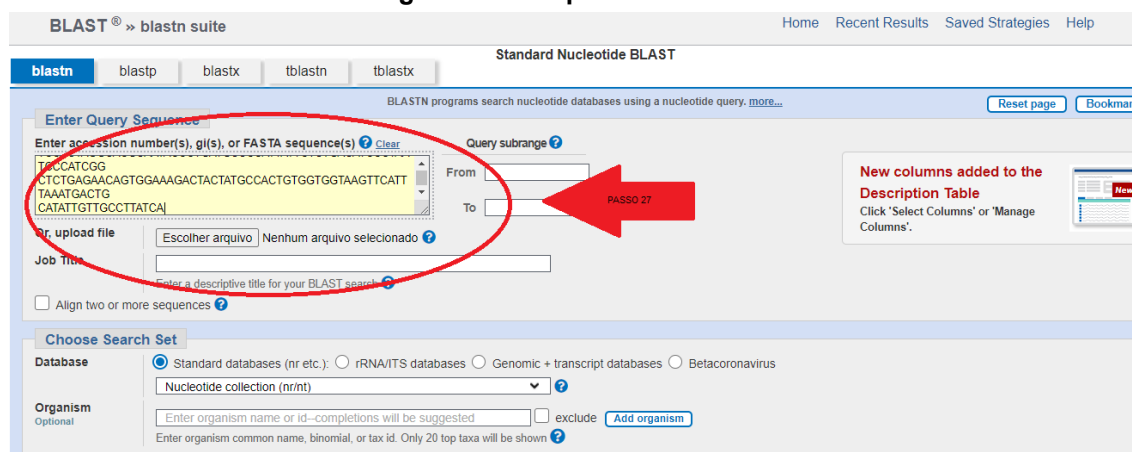
Figura 17: Pesquisa no software BLASTn



Fonte: BLASTn,(2021) adaptado por WEISS(2021).

Na página de pesquisa do BLASTn (figura 18) se insere a sequência para consulta que foi obtida no programa SMS-PCR products. Em seguida mantenha todos os parâmetros da mesma maneira e por fim clica-se na opção “**Show results in a new window**” e em “**BLAST**”.

Figura 18: Pesquisa no BLASTn



Fonte: BLASTn (2021) adaptado por WEISS (2021).

Abrirá uma nova janela como os resultados obtidos pelo alinhamento da sequência pelo BLAST (Figura 19).

Figura 19: Resultado do alinhamento do primer Blast

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Bubalus bubalis bubalis alpha-S1-casein precursor (CSN1S1) gene, CSN1S1-A allele, partial cds	Bubalus bubalis bubalis	255	255	100%	4e-64	100.00%	333	KC577235.1
Bubalus bubalis alpha-S1-casein (CSN1S1) gene, partial cds	Bubalus bubalis	250	250	100%	2e-62	99.28%	333	JQ670674.1
Bubalus bubalis clone BAC BBU_PL33 A02 genomic sequence	Bubalus bubalis	244	244	100%	8e-61	98.55%	60089	KJ635888.1
Bison bonasus isolate 5009-2007 CSN1S1 (CSN1S1) gene, exon 17 and partial cds	Bison bonasus	233	233	100%	2e-57	97.10%	370	EU862388.1
Bos indicus isolate GB44 CSN1S1 (CSN1S1) gene, exon 17 and partial cds	Bos indicus	233	233	100%	2e-57	97.10%	370	EU862387.1
Bos taurus isolate 4798-2007 CSN1S1 (CSN1S1) gene, exon 17 and partial cds	Bos taurus	233	233	100%	2e-57	97.10%	370	EU862386.1
PREDICTED: Bos taurus casein alpha s1 (CSN1S1), transcript variant X24, mRNA	Bos taurus	228	228	100%	8e-56	96.38%	1713	XM_024993015.1
PREDICTED: Bos taurus casein alpha s1 (CSN1S1), transcript variant X19, mRNA	Bos taurus	228	228	100%	8e-56	96.38%	1758	XM_024993012.1
PREDICTED: Bos taurus casein alpha s1 (CSN1S1), transcript variant X18, mRNA	Bos taurus	228	228	100%	8e-56	96.38%	1761	XM_024993011.1
PREDICTED: Bos taurus casein alpha s1 (CSN1S1), transcript variant X13, mRNA	Bos taurus	228	228	100%	8e-56	96.38%	1779	XM_024993009.1
PREDICTED: Bos taurus casein alpha s1 (CSN1S1), transcript variant X10, mRNA	Bos taurus	228	228	100%	8e-56	96.38%	1782	XM_024993008.1
PREDICTED: Bos taurus casein alpha s1 (CSN1S1), transcript variant X9, mRNA	Bos taurus	228	228	100%	8e-56	96.38%	1785	XM_024993007.1
PREDICTED: Bos taurus casein alpha s1 (CSN1S1), transcript variant X4, mRNA	Bos taurus	228	228	100%	8e-56	96.38%	1800	XM_024993005.1

Fonte: BLASTn (2021) adaptado por WEISS (2021).

Outra opção de alinhamento pode ser feito pelo software Clustal Omega disponível no site pelo link (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) (figura 20).

Figura 20: Software Clustal Omega

EMBL-EBI Services Research Training Industry About us

Clustal Omega

Input form Web services Help & Documentation Bioinformatics Tools FAQ Feedback Share

Tools > Multiple Sequence Alignment > Clustal Omega

Multiple Sequence Alignment

Clustal Omega is a new multiple sequence alignment program that uses seeded guide trees and HMM profile-profile techniques to generate alignments between **three or more** sequences. For the alignment of two sequences please instead use our [pairwise sequence alignment tools](#).

Important note: This tool can align up to 4000 sequences or a maximum file size of 4 MB.

STEP 1 - Enter your input sequences

Enter or paste a set of

Fonte: CLUSTAL OMEGA (2021).

Na opção **“STEP 1”** coloque DNA (passo 28) e coloque as informações dos primers e produtos de PCR no segundo quadro (passo 29) o resto dos parâmetros continua o mesmo e por fim clique na opção **“Submit”** (Figura 21).

Figura 21: Passo a passo do Clustal Omega

Input form | Web services | Help & Documentation | Also in this section | Feedback | Share

Important note: This tool can align up to 4000 sequences or a maximum file size of 4 MB.

STEP 1 - Enter your input sequences

Enter or paste a set of **DNA** sequences in any supported format:

```
>test1
TCCACTAGGCACGCAATACC
>test3
TCCACTAGGCACGCAATACCCTGATGCCCCATTATTCTCTGACATCCCTAATCCCATCGG
CTCTGAGAACAGTGGAAAGACTACTATGCCACTGTGGTGGTAAGTTCATTTAAATGACTG
CATATTGTTGCCCTATCA
```

Or, upload a file: Nenhum arquivo selecionado [Use a example sequence](#) | [Clear sequence](#) | [See more example inputs](#)

STEP 2 - Set your parameters

OUTPUT FORMAT

Fonte: CLUSTAL OMEGA (2021) adaptado por WEISS (2021).

Em seguida vai aparecer uma nova janela com o resultado do alinhamento (Figura 22) cada asterisco (*) significa que a base nitrogenada foi alinhada com o seu semelhante.

Figura 22: Resultado do Clustal Omega

Input form | Web services | Help & Documentation | Bioinformatics Tools FAQ | Feedback | Share

Results for job clustalo-l20210215-171055-0293-88397676-p2m

Alignments | Result Summary | Phylogenetic Tree | Results Viewers | Submission Details

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```
test1  TCCACTAGGCACGCAATACC----- 20
test3  TCCACTAGGCACGCAATACCCTGATGCCCCATTATTCTCTGACATCCCTAATCCCATCGG 60
*****
test1  ----- 20
test3  CTCTGAGAACAGTGGAAAGACTACTATGCCCTGTGGTGGTAAGTTCATTTAAATGACTG 120

test1  ----- 20
test3  CATATTGTTGCCCTATCA 138
```

Fonte: CLUSTAL OMEGA (2021) adaptado por WEISS (2021).

Após realizar os alinhamentos e conferir que os primers estão desenhados de forma correta é necessário voltar no programa SMS e procurar no canto esquerdo da tela a opção “**PCR Primer Stats**” e clique nela (passo 30), em seguida abrirá a ferramenta para realizar a estática dos primers (passo 31) (Figura 23).

Figura 23: PCR Primer Stats

bioinformatics.org/sms2/pcr_primer_stats.html

Programa para Cál... Outros Concursos STRING: redes de a... Minha Conta MENTORIA EDUAR...

SMS Sequence Manipulation Suite: PCR Primer Stats

PCR Primer Stats accepts a list of PCR primer sequences and returns a report describing the properties of each primer, including melting temperature, percent GC content, and suitability. Use PCR Primer Stats to evaluate potential PCR primers.

Paste the raw sequence or one or more FASTA sequences into the text area below. Input limit is 5,000,000 characters. The maximum accepted primer length is 50 bases.

Reverse
>T3
attaacctcactaaag
>KS
cgaggtcgacggtatcg

Submit Clear Reset

*This page requires JavaScript. See browser compatibility.
*You can mirror this page or use it off-line.

Sun 14 Jun 00:36:59 2020
Valid XHTML 1.0; Valid CSS

new window | home | citation

Sequence Manipulation Suite:
-Combine FASTA
-EMBL to FASTA
-EMBL Feature Extractor
-EMBL Trans Extractor
-Filter DNA
-Filter Protein
-GenBank to FASTA
-GenBank Feature Extractor
-GenBank Trans Extractor
-One to Three
-Range Extractor DNA
-Range Extractor Protein
-Reverse Complement
-Split Codons
-Split FASTA
-Three to One
-Window Extractor DNA
-Window Extractor Protein

Sequence Analysis
-Codon Plot
-Codon Usage
-CpG Islands
-DNA Molecular Weight
-DNA Pattern Find
-DNA Stats
-Fuzzy Search DNA
-Fuzzy Search Protein
-Ident and Sim
-Multi Rev Trans
-Mutate for Digest
-ORF Finder
-Pairwise Align Codons
-Pairwise Align DNA

PCR Primer Stats

Fonte: SMS (2021) adaptado por WEISS (2021).

Na caixa de pesquisa coloque as sequencias Forward e Reverse dos primers (passo 32) e em seguida clique na opção “**submit**” (passo 33) conforme (Figura 24).

Figura 24: Passo a passo do PCR primer stats

bioinformatics.org/sms2/pcr_primer_stats.html

Programa para Cál... Outros Concursos STRING: redes de a... Minha Conta MENTORIA EDUAR...

SMS Sequence Manipulation Suite: PCR Primer Stats

PCR Primer Stats accepts a list of PCR primer sequences and returns a report describing the properties of each primer, including melting temperature, percent GC content, and suitability. Use PCR Primer Stats to evaluate potential PCR primers.

Paste the raw sequence or one or more FASTA sequences into the text area below. Input limit is 5,000,000 characters. The maximum accepted primer length is 50 bases:

Forward
CCACTAGGCACGCAATACC
Reverse
TATAAGGCAACAATATGCAGTCA

Submit Clear Reset

*This page requires JavaScript. See browser compatibility.
*You can mirror this page or use it off-line.

Sun 14 Jun 00:36:59 2020
Valid XHTML 1.0; Valid CSS

new window | home | citation

Sequence Manipulation Suite:
-Combine FASTA
-EMBL to FASTA
-EMBL Feature Extractor
-EMBL Trans Extractor
-Filter DNA
-Filter Protein
-GenBank to FASTA
-GenBank Feature Extractor
-GenBank Trans Extractor
-One to Three
-Range Extractor DNA
-Range Extractor Protein
-Reverse Complement
-Split Codons
-Split FASTA
-Three to One
-Window Extractor DNA
-Window Extractor Protein

Sequence Analysis
-Codon Plot
-Codon Usage
-CpG Islands
-DNA Molecular Weight
-DNA Pattern Find
-DNA Stats
-Fuzzy Search DNA
-Fuzzy Search Protein
-Ident and Sim
-Multi Rev Trans
-Mutate for Digest
-ORF Finder
-Pairwise Align Codons
-Pairwise Align DNA

Fonte: SMS (2021) adaptado por WEISS (2021).

Em seguida abra uma nova janela com o resultado obtido (Figura 25), é possível observar a quantidade de harpins, dímeros e outras estáticas que podem atrapalhar o funcionamento do primer quando for testado em laboratório.

Figura 25: Resultado da estatística de primers

PCR Primer Stats results

Global settings:

-The primers do not have a 5'-phosphate group.
 -Combined concentration of K⁺ and Na⁺ in the reaction = 50 millimolar.
 -Mg²⁺ concentration in the reaction = 1.5 millimolar.
 -Primer concentration in the reaction = 200 nanomolar.

General properties:

```
-----
-----
Primer name: Forward
Primer sequence: TCCACTAGGCACGCAATACC
Sequence length: 20
  Base counts: G=3; A=6; T=3; C=8; Other=0;
  GC content (%): 55.00
Molecular weight (Daltons): 6030.97
  nmol/A260: 5.31
  micrograms/A260: 31.99
  Basic Tm (degrees C): 54
  Salt adjusted Tm (degrees C): 49
Nearest neighbor Tm (degrees C): 64.51
```

PCR suitability tests (Pass / Warning):

```
-----
Single base runs: Pass
Dinucleotide base runs: Pass
  Length: Pass
  Percent GC: Pass
Tm (Nearest neighbor): Warning: Tm is greater than 58;
  GC clamp: Pass
  Self-annealing: Pass
  Hairpin formation: Pass
```

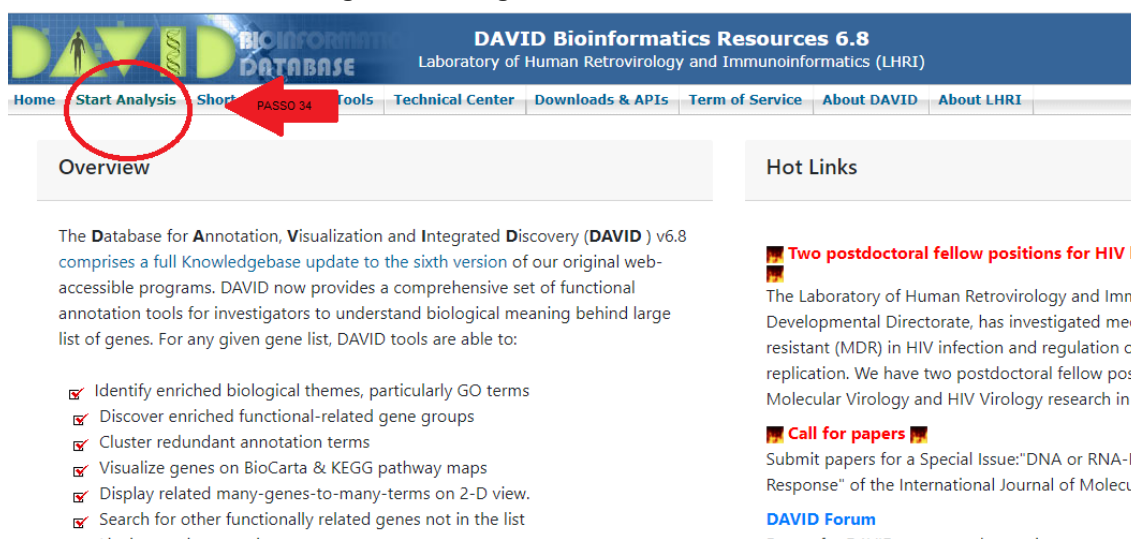
Fonte: SMS (2021) adaptado por WEISS (2021).

Todas as análises devem ser repetidas para cada gene e serem testados todos primers para ver se ele pode ser sintetizado e testado em laboratório. Em seguida será apresentado o tutorial para análises de enriquecimento de função e via e construção de rede interação proteína-proteína.

TUTORIAL PARA ANÁLISES DE ENRIQUECIMENTO DE FUNÇÃO E VIA DOS GENES

Primeiro é preciso selecionar os genes que serão analisados ex. (tabela 1) que está na primeira página do tutorial para desenvolvimento de primers. Depois vamos utilizar o programa *DAVID Bioinformatics Resources 6.8* disponível no link (<https://david.ncicfcrf.gov/>). Esse é um programa online e não precisa fazer download. Logo no início no canto superior esquerdo clique na opção “ **Start analysis**” (passo 34) conforme (Figura 26).

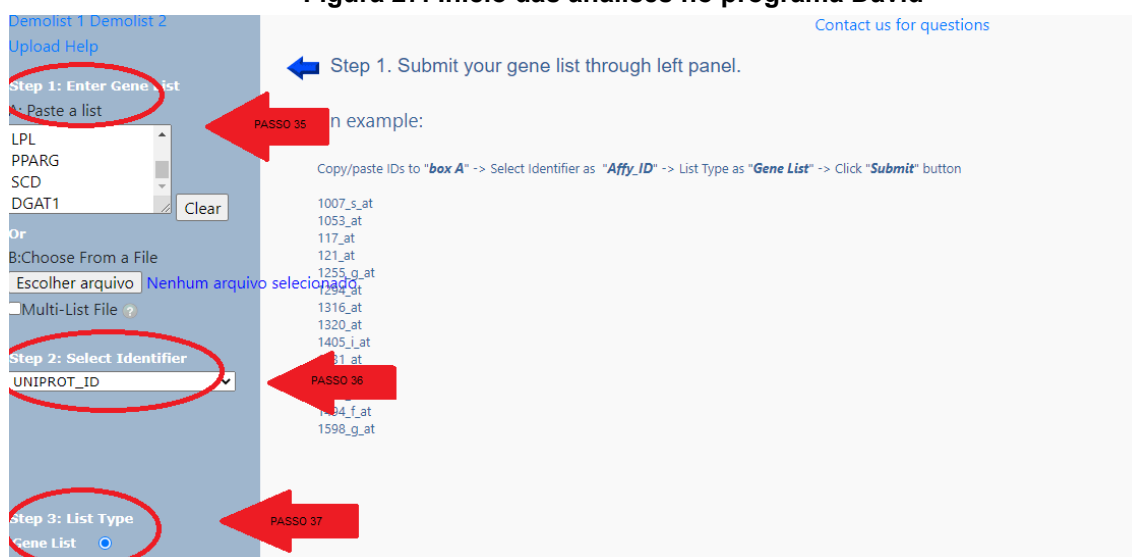
Figura 26: Programa DAVID início das análises



Fonte: DAVID (2021) adaptado por WEISS (2021).

Em seguida abrirá uma nova janela com o software de análises, no ícone “ **STEP 1**” coloque a lista dos genes que você quer pesquisar (passo 35), no “ **STEP 2**” escolha a opção UNIPROT_ID (passo 36) e no “ **STEP 3**” selecione “ **Gene List**” (passo 37) e clique em “ **Submit list**” (Figura 27).

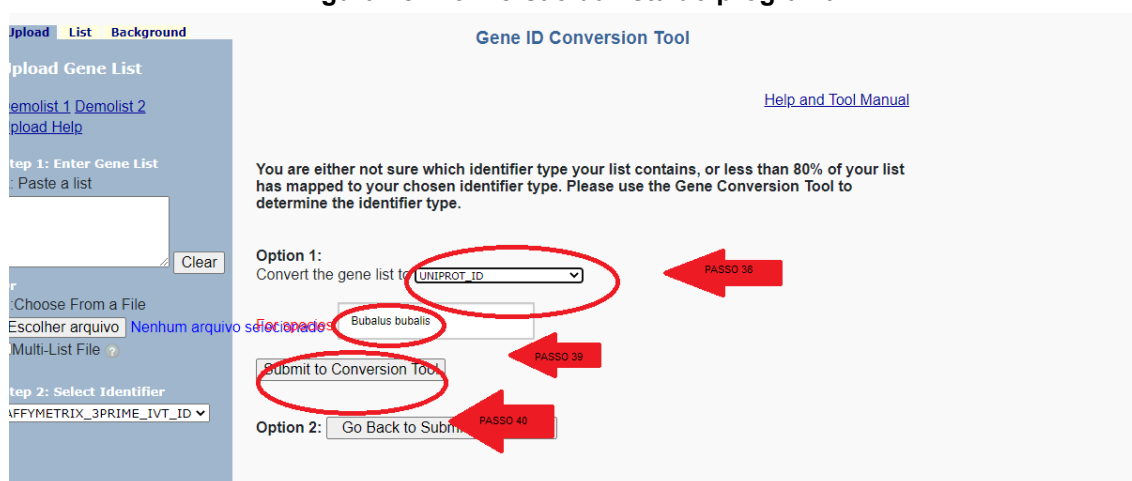
Figura 27: Início das análises no programa David



Fonte: DAVID (2021) adaptado por WEISS (2021).

O programa DAVID não aceita qualquer formato de lista para análises então aparecerá uma tela (Figura 28) para converter para o formato desejável e encontrar qual o organismo que vai ser pesquisado. Na **“Option 1”** Mude para UNIPROT_ID (passo 38) e em **“For animal”** coloque a espécie que deseja, ex. Bubalus bubalis (passo 39) e por último clique em **“Submit to conversion tool”** (passo 40).

Figura 28: Conversão da lista do programa DAVID



Fonte: DAVID (2021) adaptado por WEISS (2021).

Vai aparece uma nova janela (Figura 29) clique na opção **“Convert all”** para converter todos os genes encontrados (passo 41).

Figura 29: Conversão dos genes

Gene Accession Conversion Tool

Gene Accession Conversion Statistics

Conversion Summary		
ID Count	In DAVID DB	Conversion
0	Yes	Successful
0	Yes	None
2	No	None
8	Ambiguous	Pending

Total Unique User IDs: 10

Summary of Ambiguous Gene IDs		
ID Count	Possible Source	Convert All
8	OFFICIAL_GENE_SYMBOL	<input type="checkbox"/>

All Possible Sources For Ambiguous IDs

Ambiguous ID	Possibility	Convert
CSN3	OFFICIAL_GENE_SYMBOL	<input type="checkbox"/>
CSN2	OFFICIAL_GENE_SYMBOL	<input type="checkbox"/>
LALBA	OFFICIAL_GENE_SYMBOL	<input type="checkbox"/>
FABP4	OFFICIAL_GENE_SYMBOL	<input type="checkbox"/>
PPARG	OFFICIAL_GENE_SYMBOL	<input type="checkbox"/>
CSN1S1	OFFICIAL_GENE_SYMBOL	<input type="checkbox"/>
SCD	OFFICIAL_GENE_SYMBOL	<input type="checkbox"/>
DGAT1	OFFICIAL_GENE_SYMBOL	<input type="checkbox"/>

← PASSO 41

Fonte: DAVID (2021) adaptado por WEISS (2021).

Em seguida aparecerá uma nova janela (Figura 30) com a lista convertida para o formato que o programa aceita, então clique na opção “**Submit converted list to David as a gene list**” (passo 42) e abra uma caixa de texto com opção de salvar direto no programa DAVID, é só colocar o nome que desejar.

Figura 30: Lista convertida para o programa DAVID

Gene Accession Conversion Tool

Gene Accession Conversion Statistics

Conversion Summary		
ID Count	In DAVID DB	Conversion
8	Yes	Successful
0	Yes	None
2	No	None
0	Ambiguous	Pending

Total Unique User IDs: 10

Summary of Ambiguous Gene IDs		
ID Count	Possible Source	Convert All
8	OFFICIAL_GENE_SYMBOL	<input type="checkbox"/>

All Possible Sources For Ambiguous IDs

Ambiguous ID	Possibility	Convert
CSN3	OFFICIAL_GENE_SYMBOL	<input type="checkbox"/>
CSN2	OFFICIAL_GENE_SYMBOL	<input type="checkbox"/>
LALBA	OFFICIAL_GENE_SYMBOL	<input type="checkbox"/>
FABP4	OFFICIAL_GENE_SYMBOL	<input type="checkbox"/>
PPARG	OFFICIAL_GENE_SYMBOL	<input type="checkbox"/>
CSN1S1	OFFICIAL_GENE_SYMBOL	<input type="checkbox"/>
SCD	OFFICIAL_GENE_SYMBOL	<input type="checkbox"/>
DGAT1	OFFICIAL_GENE_SYMBOL	<input type="checkbox"/>

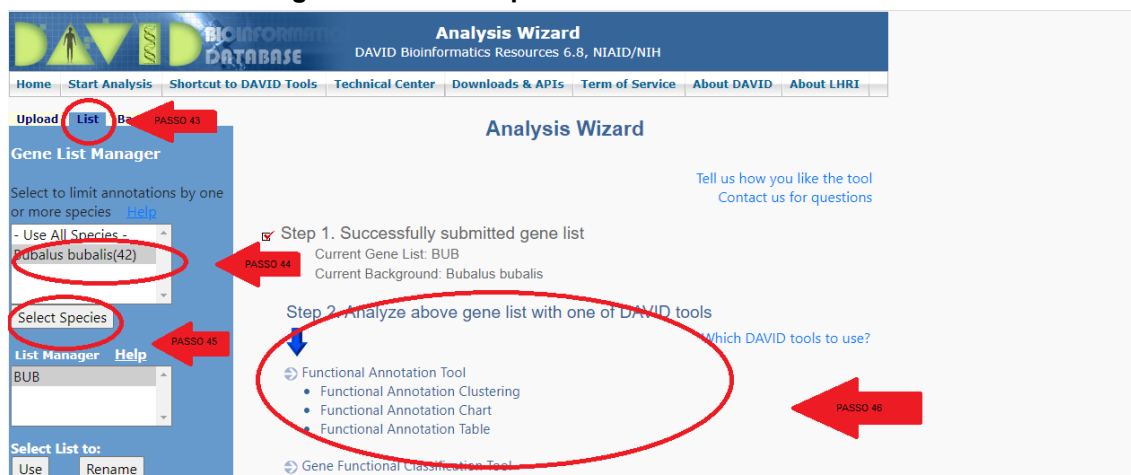
Submit Converted List to DAVID as a Gene List ← PASSO 42

From	To	Species	David Gene Name
FABP4	L7XDG1_BUBBU	Bubalus bubalis	fatty acid binding protein 4(FABP4)
DGAT1	H2ESR2_BUBBU	Bubalus bubalis	diacylglycerol O-acyltransferase 1(DGAT1)
DGAT1	I1VR20_BUBBU	Bubalus bubalis	diacylglycerol O-acyltransferase 1(DGAT1)
DGAT1	M1R328_BUBBU	Bubalus bubalis	diacylglycerol O-acyltransferase 1(DGAT1)
DGAT1	W8S2K0_BUBBU	Bubalus bubalis	diacylglycerol O-acyltransferase 1(DGAT1)
DGAT1	G4XPN3_BUBBU	Bubalus bubalis	diacylglycerol O-acyltransferase 1(DGAT1)
DGAT1	M1QVZ6_BUBBU	Bubalus bubalis	diacylglycerol O-acyltransferase 1(DGAT1)
DGAT1	Q4SQE7_BUBBU	Bubalus bubalis	diacylglycerol O-acyltransferase 1(DGAT1)
DGAT1	Q0ZK39_BUBBU	Bubalus bubalis	diacylglycerol O-acyltransferase 1(DGAT1)
DGAT1	Q1LZN4_BUBBU	Bubalus bubalis	diacylglycerol O-acyltransferase 1(DGAT1)
DGAT1	Q3Y444_BUBBU	Bubalus bubalis	diacylglycerol O-acyltransferase 1(DGAT1)
DGAT1	Q3LSL3_BUBBU	Bubalus bubalis	diacylglycerol O-acyltransferase 1(DGAT1)
DGAT1	B5TV92_BUBBU	Bubalus bubalis	diacylglycerol O-acyltransferase 1(DGAT1)
SCD	Q0GR13_BUBBU	Bubalus bubalis	stearoyl-CoA desaturase(SCD)
SCD	Q0GR12_BUBBU	Bubalus bubalis	stearoyl-CoA desaturase(SCD)
SCD	A4IEA5_BUBBU	Bubalus bubalis	stearoyl-CoA desaturase(SCD)
SCD	Q4PIH6_BUBBU	Bubalus bubalis	stearoyl-CoA desaturase(SCD)
CSN3	Q712N6_BUBBU	Bubalus bubalis	casein kappa(CSN3)

Fonte: DAVID (2021) adaptado por WEISS (2021).

Volte para o programa DAVID (Figura 31) e clique na opção “**List**” (passo 43) lá já vai estar salvo a lista convertida da espécie que foi colocada (passo 44), clique na opção “**Select species**” (passo 45) e do lado aparecera as análises que foram feitas (passo 46).

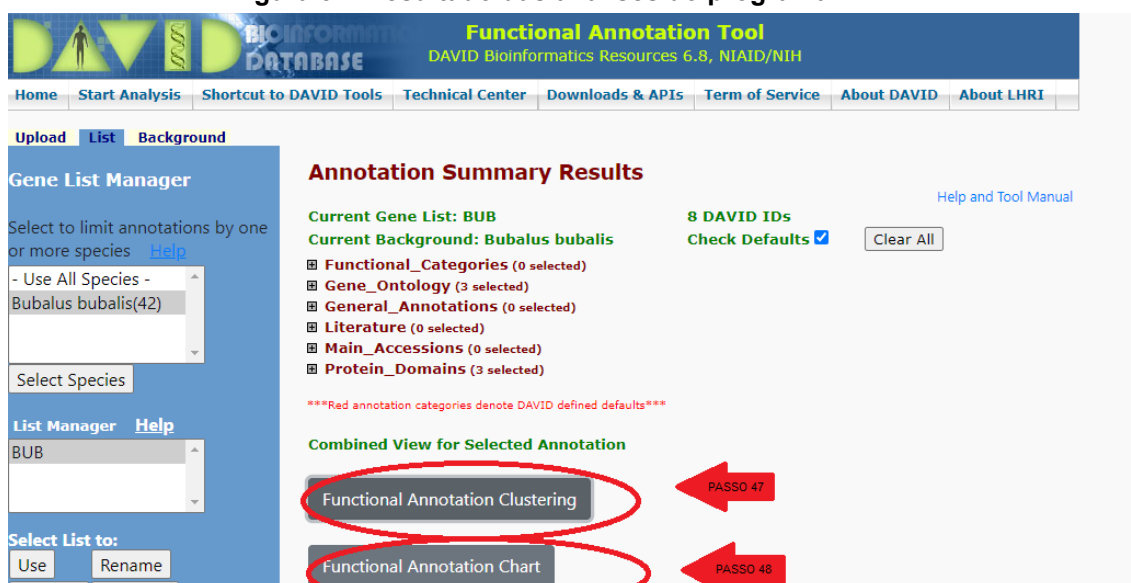
Figura 31: Passo a passo das análises do DAVID



Fonte: DAVID (2021) adaptado por WEISS (2021).

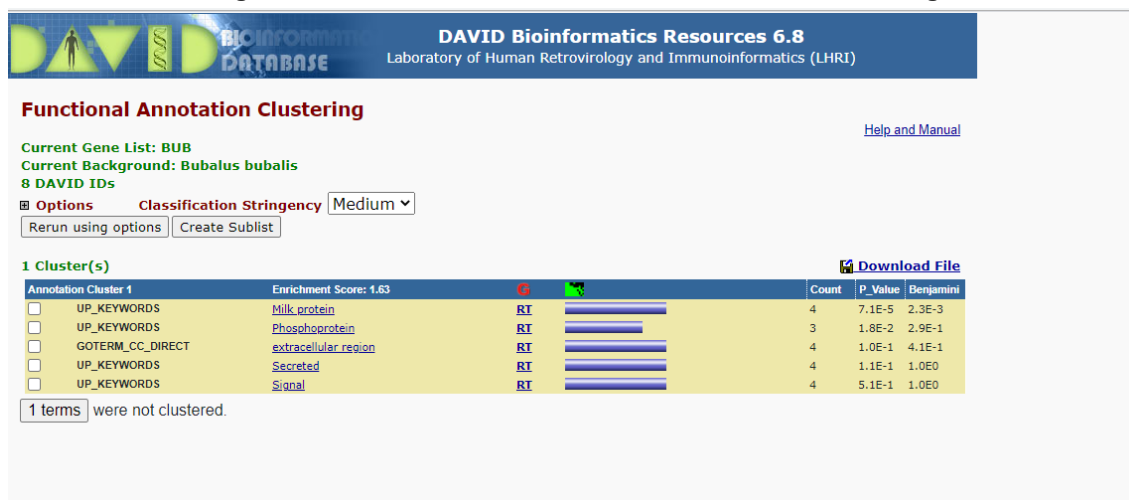
Vai abrir uma nova janela (Figura 32), clique na opção **Functional Annotation Clustering** (passo 47) e aparecerá a tabela que foi gerada para essa análise (Figura 33), se clicar em **Functional Annotation Chart** Aparecerá a tabela que foi gerada para essa análise (Figura 34) e o mesmo ocorre com todas as análises.

Figura 32: Resultado das análises do programa DAVID



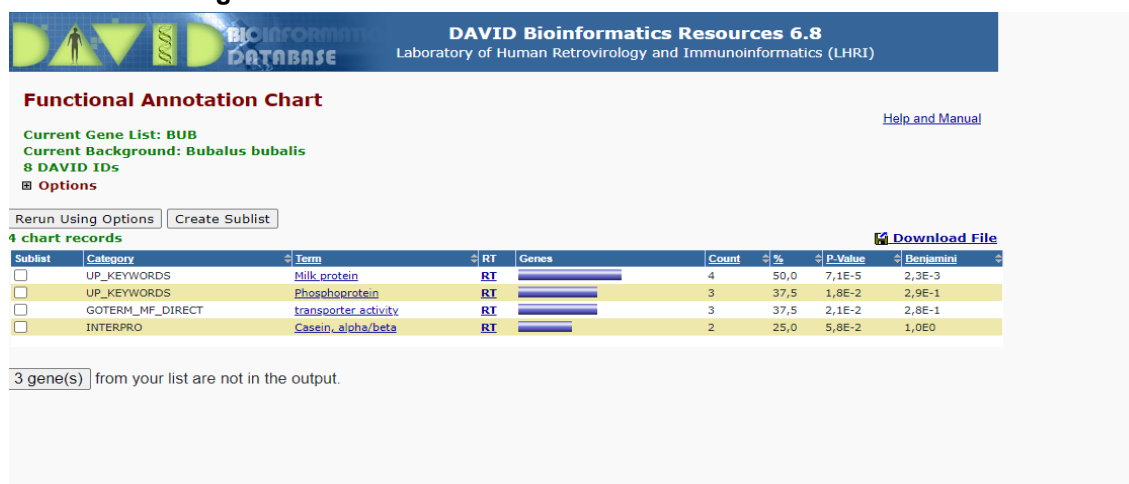
Fonte: DAVID (2021) adaptado por WEISS (2021).

Figura 33: Resultado da Functional Annotation Clustering



Fonte: DAVID (2021) adaptado por WEISS (2021).

Figura 34: Resultado da análise Functional Annotation Chart



Fonte: DAVID (2021) adaptado por WEISS (2021).

As análises de enriquecimento de função e via são mais complexas de entender e exigem mais leitura, porém são análises essenciais para entender a função que cada gene desempenha. Outra opção para fazer a análise de enriquecimento funcional é utilizar o Gene Ontology disponível no link (<http://geneontology.org/>), logo no início do site aparece no canto inferior direito uma caixa para análises de enriquecimento funcional (Figura 35).

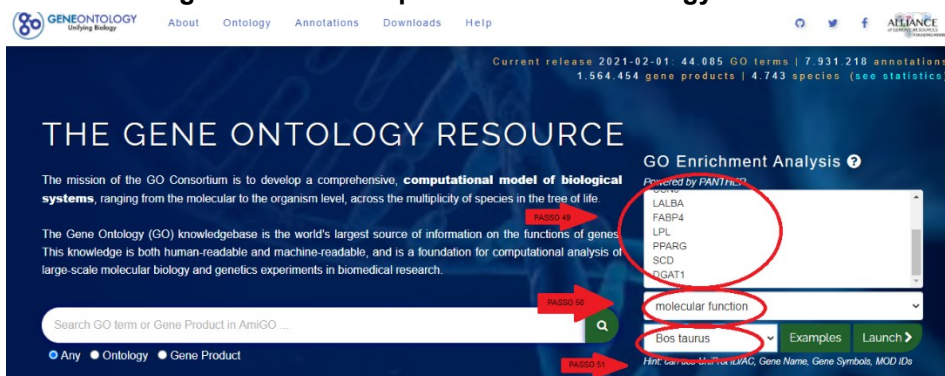
Figura 35: Gene Ontology



Fonte: GENE ONTOLOGY (2021).

Na primeira caixinha cole a lista de genes (passo 49) em seguida escolha o tipo de análise que você quer (passo 50) ex. *Molecular Function* e selecione a espécie ex. *Bos taurus*, nesse banco de dados não tem informações sobre os bubalinos então utilizei os bovinos como exemplo (passo 51) e por último clique na opção **“Launch”**.

Figura 36: Passo a passo do Gene Ontology



Fonte: GENE ONTOLOGY (2021) adaptado por WEISS (2021).

Em seguida aparecerá uma nova janela com a tabela de resultados da análise de enriquecimento de função e via dos genes que foram pesquisados (Figura 37).

Figura 37: Resultado da análise pelo Gene Ontology

Export [Table](#) [XML with user input ids](#) [JSON with user input ids](#)

Displaying only results for FDR P < 0.05, [click here to display all results](#)

	Bos taurus (REF)	upload_1 (▼ Hierarchy_NEW1 ©)					
GO molecular function complete	#	#	expected	Fold Enrichment	+/-	raw P value	FDR
lactose synthase activity	3	2	.00	> 100	+	3.49E-06	1.52E-02
↳ UDP-galactosyltransferase activity	15	2	.01	> 100	+	4.73E-05	2.58E-02
↳ galactosyltransferase activity	19	2	.01	> 100	+	7.30E-05	3.53E-02
retinol O-fatty-acyltransferase activity	4	2	.00	> 100	+	5.24E-06	1.14E-02
zymogen binding	5	2	.00	> 100	+	7.33E-06	1.07E-02
diacylglycerol O-acyltransferase activity	5	2	.00	> 100	+	7.33E-06	7.99E-03
↳ acylglycerol O-acyltransferase activity	22	2	.01	> 100	+	9.58E-05	4.18E-02
long-chain fatty acid binding	12	2	.01	> 100	+	3.17E-05	2.30E-02
long-chain fatty acid transporter activity	15	2	.01	> 100	+	4.73E-05	2.95E-02
identical protein binding	1451	7	.89	7.86	+	9.89E-06	8.62E-03

Fonte: GENE ONTOLOGY (2021).

TUTORIAL DE CONSTRUÇÃO DE UMA REDE DE INTERAÇÃO PROTEINA-PROTEINA.

Para construir a rede de interação proteína-proteína serão utilizados os genes que estão na tabela 1 do tutorial de desenvolvimento de primers. O programa utilizado é o *String version 11.0* disponível no link (<https://string-db.org/>) (figura 38).

Figura 38: Início do programa String

VERSION: 11.0 LOGIN REGISTER

STRING Search Download Help My Data

Protein by name > SEARCH

Protein by sequence >

Multiple proteins >

Multiple sequences >

Proteins with Values/Ranks **New** >

Organisms >

Protein families ("COGs") >

Examples >

Single Protein by Name / Identifier

Protein Name: (examples: #1 #2 #3)

Organism: auto-detect

Advanced Settings

Fonte: STRING (2021).

No canto direito clique em **“ Multiple proteins ”** (passo 52), no lado esquerdo vai aparecer algumas caixas de pesquisas (Figura 39), na primeira onde está escrito

“ **List Of Names:**” coloque os nomes dos genes (passo 53), em seguida na opção “ **Organism**” coloque o nome científico da espécie (passo 54) e clique em “ **Search**” (passo 55).

Figura 39: Passo a passo para análises no programa String

Fonte: STRING (2021) adaptado por WEISS (2021).

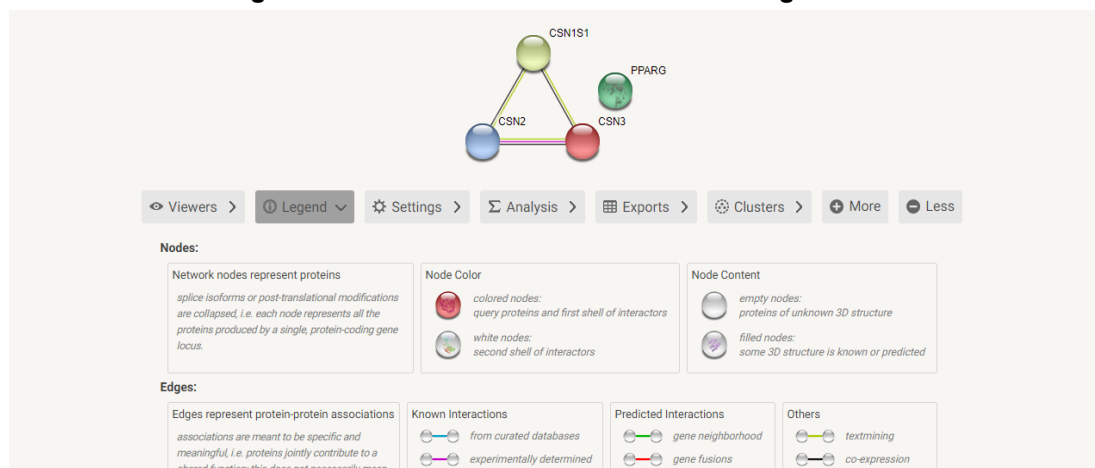
Na sequência vai abrir uma nova janela para conferir se são os genes que você quer utilizar para elaborar a rede de interação proteína-proteína (Figura 40). Confira se está tudo certo e clique em “ **continue**” (passo 58).

Figura 40: Pagina para conferir os genes no String

Fonte: STRING (2021) adaptado por WEISS (2021).

Por último abrirá uma nova janela com os resultados (Figura 41), mostrando a rede de interação de proteína-proteína e algumas análises correspondente a esse resultado.

Figura 41: Resultados das análises do String



Fonte: STRING (2021) adaptado por WEISS (2021).