

Polimorfismo da hemoglobina de bubalinos (*Bubalis bubalis*) da raça Murrah criados no Estado de São Paulo, Brasil

Hemoglobin polymorphism in Murrah buffaloes breed in São Paulo State, Brazil

AYRES, M.C.C.^{1*}; BIRGEL JÚNIOR, E.H.²; ROSENFELD, A. M. F.²; BIRGEL, E.H.²

¹ Maria Consuêlo Caribé Ayres, Escola de Medicina Veterinária, Departamento de Patologia e Clínicas-UFBA ;

² Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – USP.

*Endereço para correspondência: cayres@ufba.br

RESUMO

Os tipos de hemoglobina foram determinados em 41 amostras de sangue de bubalinos sadios da raça Murrah, criados no município de Roseira, no Estado de São Paulo, sendo cinco animais machos e 36 fêmeas. As amostras sanguíneas foram colhidas por venipunção da jugular, em tubos contendo EDTA e a determinação dos tipos de hemoglobina foi realizada pela técnica de eletroforese alcalina em acetato de celulose, utilizando-se o Tris-EDTA-Borato (pH 8,6) como solução tampão. Duas bandas de migração relativas aos alelos HbA e HbB foram observadas, identificando-se dois genótipos Hb-AA e Hb-AB e as suas frequências na população avaliada foram: 95,1% dos bubalinos apresentaram o tipo heterozigoto Hb-AB e 4,9% o tipo homozigoto Hb-AA. O polimorfismo da hemoglobina foi observado nos bubalinos e o genótipo heterozigoto Hb-AB foi o mais freqüente.

Palavras-chave: bubalinos, genética, hematologia, polimorfismo da hemoglobina

INTRODUÇÃO

Os bubalinos foram introduzidos no Brasil há mais de um século, são animais criados em todos os continentes, sendo utilizados na produção de leite, carne e, também, no trabalho agrícola (JORGE et al., 2005). Atualmente, a exploração desses animais encontra-se em desenvolvimento em várias regiões do país, devido a muitos fatores, mas, principalmente, pela sua rusticidade, em áreas onde a criação zootécnica de bovinos não é eficiente. Porém,

SUMMARY

Hemoglobin types were determined in 41 blood samples of healthy adult Murrah buffaloes, bred in Roseira, State of São Paulo. Blood samples of five males and 36 females were collected from the jugular vein in tubes containing EDTA. The hemoglobin typing was performed by electrophoresis in cellulose acetate using Tris-EDTA-Borate (pH 8.6) buffer solution. Two migration bands associated to allele HbA and HbB were found, corresponding to two genotypes (Hb-AA and Hb-AB), and showing the following frequencies in the evaluated buffalo population: 95.1% of the buffaloes showing the heterozygous Hb-AB, and the homozygous Hb-AA in 4.9%. The hemoglobin polymorphism occurred among the buffaloes and the heterozygous genotype Hb-AB was the most predominant.

Key words: water buffaloes, genetics, hematology, hemoglobin polymorphism.

ainda são escassas as informações na literatura sobre as suas características genéticas e fisiológicas, o que limita a produção dos bubalinos de forma mais racional (CAMINHAS et al., 2000).

Estudos sobre a herdabilidade das características sanguíneas permitiram a identificação de tipos de hemoglobinas, as quais foram consideradas marcadores de produção (KOHAYAGAWA et al., 1979), de

rusticidade e tolerância de raças introduzidas em climas tropicais (EVANS, 1963; MITAT, 1975; BORTOLOZZI, 1979), produção de leite e teor de gordura (BACHMANN et al., 1978), assim como sugeriram que os tipos de hemoglobina estão associados à susceptibilidade de algumas enfermidades (BANGHAN e BLUMBERGER, 1958).

O polimorfismo da hemoglobina dos bubalinos tem sido discutido nos países onde esses animais apresentam importância econômica e o padrão de migração eletroforética descrito é controverso. Padrões de migração eletroforética com três bandas distintas foram observadas na Índia e no Brasil (VELLA, 1958; CAMINHAS et al., 1998). Balanni e Barnabás (1965) citaram ter observado bandas de migração que caracterizavam o polimorfismo da hemoglobina de bubalinos, enquanto SEN et al. (1966), apesar da identificação de dois tipos, relataram que esses eram monomórficos. Os genótipos da hemoglobina de bubalinos descritos na literatura são: os homozogotos Hb-AA e Hb-BB e o heterozigoto Hb-AB, sendo esse último predominante (VELLA, 1958; BALANNI e BARNABÁS, 1965; NAIK e SUKUMARAM, 1967; MASINA et al., 1977; TONHATI et al., 1988; CAMINHAS et al., 1998; CAMINHAS et al. 2000; IORIO et al., 2004).

Em bubalinos criados na Itália (IORIO et al., 2004) foram obtidas as frequências de 95,1% e 4,9% para os genótipos Hb-AB e Hb-AA, respectivamente, resultado correspondente ao observado no presente estudo, demonstrando ser raro o tipo Hb-AA, tanto naquele país quanto no Brasil. Em búfalos da raça Murrah, registraram-se as frequências iguais a 32,41%, 62,16% e 5,41% para os genótipos Hb-AA, Hb-AB e um terceiro tipo com três bandas, nessa ordem (CAMINHAS et al., 1998). E, finalmente, em bubalinos da raça Mediterrâneo, as frequências observadas para os genótipos Hb-AB e Hb-AA foram 76,67% e 23,33%, respectivamente (CAMINHAS et al.; 1998).

O objetivo deste trabalho foi identificar e determinar a frequência dos tipos de

hemoglobina, utilizando a técnica de eletroforese alcalina em acetato de celulose em búfalos da raça Murrah, criados na região de Roseira no Estado de São Paulo.

ANIMAIS

Foram utilizadas 41 amostras de sangue de bubalinos adultos, clinicamente saudáveis, sendo cinco machos e 36 fêmeas, procedentes de rebanhos mantidos no município de Roseira, no Estado de São Paulo, e criados sob o sistema de exploração extensiva. Os animais incluídos nesta pesquisa apresentavam controle sanitário estabelecido para os rebanhos da região, sendo vermifugados para parasitos gastrointestinais.

MÉTODOS

O sangue foi colhido por punção da veia jugular em tubos contendo uma solução aquosa de etileno diamino tetracetato tripotássico (EDTA-K3) a 15%, tendo sido, a seguir, o material acondicionado em gelo para o transporte das amostras que foram mantidas sob refrigeração até a realização dos exames. Após a realização do eritrograma, os tipos de hemoglobina foram identificados pela técnica de eletroforese alcalina em acetato de celulose, tendo o Tris-EDTA-Borato (pH 8,6) como solução tampão. Para caracterização dos tipos de hemoglobina foram realizadas lavagens sucessivas do sangue em solução salina a 0,85% por centrifugação a 1.500g, durante três vezes ou até o sobrenadante apresentar-se límpido, e após isto era desprezado, mantendo-se a papa de hemácia. A seguir foi adicionado um terço do volume de água destilada à papa de hemácias para provocar a hemólise, sendo então congelada por 24 horas e, finalmente, adicionado igual volume de clorofórmio ao hemolisado, centrifugado a 2.500g, durante 20 minutos para separação do estroma, sendo então, realizada a eletroforese, seguindo-se a técnica descrita por Naoum (1997). Com a finalidade de orientação da migração das

bandas a serem obtidas, foram aplicadas duas amostras controle nas fitas de acetato de celulose: uma procedente de sangue humano com Hb-AS e outra de sangue de bovino com

genótipo conhecido Hb-AB (AYRES, 2002). As freqüências dos tipos de hemoglobina tiveram seus resultados apresentados em porcentagem (%).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 41 amostras avaliadas obtidas de bubalinos da raça Murrah, foram identificadas duas faixas de migração

relativas aos alelos HbA e HbB com a presença de dois genótipos, Hb-AA e Hb-AB, conforme apresentados nas figuras 1 e 2 e tabela 1.

Tabela 1- Freqüência dos genótipos de hemoglobina de bubalinos da raça Murrah, criados no Estado de São Paulo. São Paulo, 2004.

Nº de animais	Genótipos da hemoglobina		Freqüência dos genótipos da hemoglobina (%)	
	Hb-AA	Hb-AB	Hb-AA	Hb-AB
41	02	39	4,88	95,12

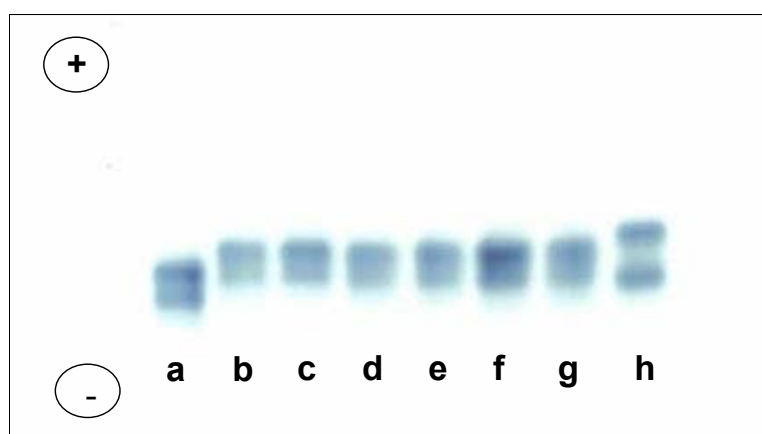


Figura 1 - Eletroforese alcalina em acetato de celulose, pH 8,6 (a) Hb-AS humana; (b, c, d, e, f, g) Hb-AB de bubalinos; (h) Hb-AB de bovinos.

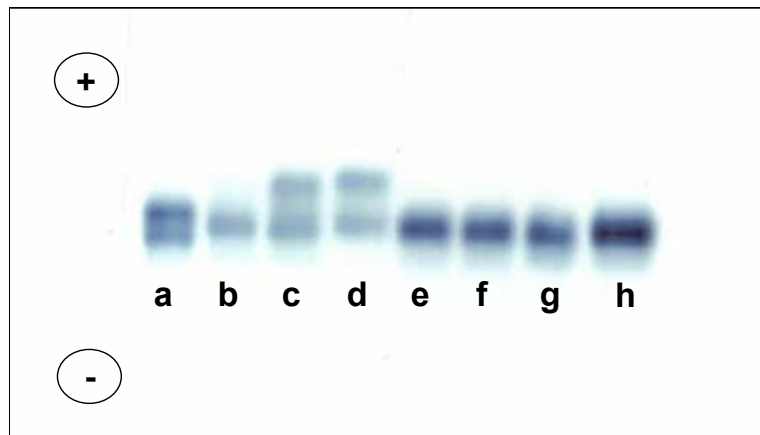


Figura 2- Eletroforese alcalina em acetato de celulose, pH 8,6 (a) Hb-AS humana, (b, e ,f); Hb-AA de bovinos; (g, h) Hb-AA de bubalinos; (c, d) Hb-AB de bovinos

Esses genótipos correspondem aos anteriormente observados por outros autores que também verificaram a Hb-AA com uma banda de migração lenta e a Hb-AB com duas bandas de migração, a lenta e a mais rápida (VELLA, 1958; BALANI e BARNABAS, 1965; NAIK e SUKUMARAN, 1967; KHANNA e BRAEND, 1968; TONHATI et al., 1988; CAMINHAS et al., 2000), caracterizando o polimorfismo da hemoglobina nos bubalinos, entretanto outros estudos consideraram a hemoglobina de bubalinos como monomórfica, com apenas uma banda de migração eletroforética (SEN et al., 1966; MASINA et al., 1977), não tendo sido encontrada, nas amostras analisadas, a existência de uma terceira banda de migração, como observado por Caminhas et al. (1998) em 5,41% na população avaliada de sua pesquisa. Neste estudo observou-se que, nas bandas de migração que caracterizaram o genótipo Hb-AB, a banda mais lenta corresponde exatamente à zona de migração da banda lenta do alelo HbA dos bovinos (AYRES, 2002), no entanto, a banda de migração rápida dos bubalinos

mostrou-se um pouco mais lenta que a banda rápida dos bovinos que corresponde ao alelo HbB, como demonstrado nas figuras 1 e 2. Essas características de migração foram, anteriormente, comentadas nos estudos de dois pesquisadores (NAIK e SUKUMARAM, 1967; TONHATI et al., 1988), que consideraram existir variações mais complexas no padrão da hemoglobina de bubalinos do que no de outros ruminantes.

Em relação às frequências observadas e apresentadas na Tabela 1, o genótipo heterozigoto Hb-AA foi o menos freqüente, com valor igual a 4,9%, e o genótipo heterozigoto Hb-AB, com valor igual a 95,1%, o predominante. Valores semelhantes foram obtidos em bubalinos criados na Itália (IORIO et al., 2004), entretanto, diferiram quanto aos observados em bubalinos da raça Murrah e Mediterrâneo, criados no Estado de São Paulo, em que predominou o heterozigoto Hb-AB (CAMINHAS et al., 1998; CAMINHAS et al., 2000).

Com o suporte da literatura consultada e devido à importância dos bubalinos na indústria

agropecuária (JORGE et al., 2005), e a possibilidade da influência dos tipos de hemoglobina no setor de produção (EVANS, 1963; MITAT, 1975; BACHMANN et al., 1978; KOHAYAGAWA et al., 1979; BORTOLOZZI, 1979), bem como marcador de

susceptibilidade de algumas doenças (BANGHAN e BLUMBERGER, 1958) pesquisas para avaliar as variantes das hemoglobinas de bubalinos devem ter continuidade para esclarecer adequadamente o padrão dos animais criados no Brasil.

CONCLUSÃO

Com base nas amostras avaliadas conclui-se que a técnica de eletroforese em acetato de celulose (pH 8,6) foi eficiente para a identificação dos tipos de hemoglobina de bubalinos, sendo essa polimórfica, e que os

animais da raça Murrah apresentaram bandas de migração eletroforética características dos genótipos Hb-AA e Hb-AB, sendo o último predominante na população estudada.

REFERÊNCIAS

AYRES, M.C.C. **Tipos de hemoglobina de bovinos**: dinâmica das hemoglobinas fetais e adultas, e das atividades das enzimas do metabolismo eritrocitário de bezerros, desde o nascimento até 180 dias de vida, criados no Estado de São Paulo, 2002. 207 f. Tese (Doutorado em Clínica Veterinária) - Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. São Paulo.

BACHAMANN, A.W.; CAMPBELL, R.S.F.; YELLOWLEES, D. Haemoglobins in cattle and buffalo. **Australian Journal of Experimental Biology in Medicine Science**, v.56, p.623-629, 1978.

BALANI, A.S.; BARNABAS, B.S. Polypeptide chains of buffaloes haemoglobins. **Nature**, v.205, p.1019-1021, 1965.

BANGHAM, A. D.; BLUMBERG, B. S. Distribution of eletrophoretically different haemoglobins among some cattle breeds of Europe na Africa. **Nature**, v. 181, p. 1551-1552, 1958.

BORTOLOZZI, J. **Grupos sanguíneos e polimorfismo bioquímico em bovinos da raça Canchim**. 1979. 56 f. Tese (Livre Docência) – Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho, Botucatu.

CAMINHAS, M.M.T.; MACEDO, M.P.; PERRI, S.H.V.; RAMOS, P.R.R. Tipificação de hemoglobinas de bubalinos da raça Murrah criados na região de Araçatuba, SP. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE CRIADORES DE ZEBU, 35., 1998, Botucatu. **Anais...** Botucatu: SBZ, 1998. p.553-555.

CAMINHAS, M.M.T.; MACEDO, M.P.; PERRI, S.H.V.; LOVATO, R.L. Análise do tipo de hemoglobina e da resistência globular osmótica eritrocitária em bubalinos – peso aos 18 meses. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE CRIADORES DE ZEBU, 37, 2000, Viçosa. **Anais...** Viçosa: SBZ, 2000. p.122-125.

EVANS, J.V. Adaptation to subtropical environments by zebu and British breeds of cattle in relation to erythrocyte character. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.14, p.559-571, 1963.

IORIO, M.; VICENTI, D.; ANNUNZIATA, M.; BONAMASSA, R.; DI LUCCAIA, A.; PIERAGOSTINI, E. Biochemical and molecular investigation on qualitative and quantitative Hb polymorphism in the river buffalo (*Bubalus bubalis* L.) population reared in Southern Italy. **Genetics and Molecular Biology**, v.27, p.167-173, 2004.

JORGE A M.; ANDRIGHETTO, C.; CASTRO, V.S. Desenvolvimento ponderal de bubalinos da raça Murrah, criados em pastagens de Brachiaria brizantha no centro-oeste do Estado de São Paulo, Brasil. **Ciência Rural**, v.35, p.417-421, 2005.

KHANNA, N.D.; BRAEND, M. Haemoglobin and albumin polymorphism in Indian Water buffaloes. **Acta Veterinaria Scandinavia**, v.9, p.316-327, 1968.

KOHAYAGAWA, A.; VILLARES, J. B.; ROCHA, G. P.; MENDES, A. A. Perfil metabólico e ganho de peso das búfalas Murrah e Mediterrâneo. In: _____ **Bubalinos**. Campinas: Fundação Cargil, 1979. p. 170-190.

MASINA, P.; IANNELI, D.; RAMUND, L. Hemoglobin polymorphism in Italian water buffalo (*Bubalus bubalis*). Animal blood groups biochemistry. **Genetic**, v.8, p.65-92, 1977.

MITAT, J. Os marcadores genéticos em el ganado cubano. **Ciências Agropecuárias**, v. 8, p. 65-72, 1975.

NAIK, S.N.; SUKUMARAN, P.K. Haemoglobin polymorphism in Indian Water Buffaloes. In: EUROPEAN CONFERENCE ON ANIMAL BLOOD GROUPS AND BIOCHEMICAL POLIMORPHISM, 100., 1967, Paris. **Proceedings...** Paris, 1967, p.401-406.

NAOUM, P. C. **Hemoglobinopatias e talassemias**. São Paulo: Sarvier, 1997. 171 p.

SEN, A.; ROY, D.; BHATTACHARYA, S.; DEB, N.C. Haemoglobins of Indian zebu cattle and the Indian Buffalo. **Journal of Animal Science**, v.25, p.445-447, 1966.

TONHATI, H.; BARACAT, R.S.; SILVA, R.G.; COSTA, M.J.R.P. Polimorfismo de hemoglobina em búfalo. **Arquivos de Veterinária**, v. 4, p.77-81, 1988.

VELLA, F. Haemoglobin types in Ox and Buffalo. **Nature**, v.181, p.564-565, 1958.