



Evento	Salão UFRGS 2014: SIC - XXVI SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS
Ano	2014
Local	Porto Alegre
Título	Desenvolvimento e validação de PCR em tempo real para detecção de DNA mitocondrial bovino em amostras de alimentos para consumo animal
Autor	CLEITON SCHNEIDER PEREIRA
Orientador	NILO IKUTA
Instituição	Universidade Luterana do Brasil

Material de origem animal possui um alto valor biológico devido à elevada qualidade nutricional, com proporções ideais de todos os aminoácidos para atender às necessidades orgânicas das mais diversas espécies animais. Dessa forma, subprodutos do abate (como ossos, sangue e vísceras) são bastante utilizados para o enriquecimento proteico de alimentos processados, suplementos e rações, favorecendo o ganho de massa muscular nos animais. No entanto, o uso deste tipo de matéria-prima tem sido indesejado na alimentação bovina, principalmente pelo risco de aparecimento da encefalopatia espongiforme, conhecida popularmente como doença da vaca louca. Técnicas de biologia molecular permitem uma avaliação precisa do material genético (DNA) neste tipo de situação, permitindo a detecção da presença de qualquer espécie animal nos mais diversos tipos de alimentos. O objetivo deste estudo foi desenvolver e validar um teste de reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real para detecção específica de DNA mitocondrial bovino, possibilitando assim a análise da presença de material de origem bovina em alimentos para consumo animal. Inicialmente foi realizada uma revisão de literatura, sendo selecionados oligonucleotídeos (par de iniciadores e sonda) com sequências específicas de DNA mitocondrial bovino. Em paralelo, foram obtidas amostras de diferentes tecidos bovinos (pelo, sangue, fígado). O DNA de todas as amostras foi extraído pelo método de adsorção em sílica com o uso de reagentes comerciais NewGene (Simbios Biotecnologia, Cachoeirinha, RS. Brasil). O teste de PCR em tempo real foi implementado utilizando DNA extraído de uma amostra de fígado. As reações de amplificação foram realizadas em StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems), com as seguintes condições de amplificação: 1 ciclo a 95°C (3 minutos), 40 ciclos a 95°C (15 segundos) e a 60°C (60 segundos). Os resultados da PCR em tempo real foram avaliados através de um gráfico, onde foi definido o ciclo no qual as amostras passaram a ser detectadas (CT, *Cycle Threshold*) e classificadas em positivas e negativas. A sensibilidade analítica foi determinada a partir de diluições decimais (9 replicatas) da amostra de fígado. Os resultados demonstraram uma sensibilidade analítica muito boa e ampla faixa de linearidade do teste. As médias de CT e os desvios-padrão (DP) observados para cada diluição foram de: CT = 15,3 (DP = 1,2) para o ponto concentrado e CT = 18,3 (DP = 1,5), CT = 22,2 (DP = 1,0), CT = 25,7 (DP = 1,0), CT = 29,4 (DP = 1,5) e CT = 33,9 (DP = 1,9) para as respectivas diluições 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} . O teste manteve linearidade até a diluição 10^{-5} , considerado o limite de detecção desta técnica, portanto, amostras com valores de CT superior a 37 foram consideradas negativas. Posteriormente, dois tipos de amostras (sangue e pelo) de 16 animais foram submetidas ao processo completo de análise. Todas as amostras apresentaram resultados positivos, sendo que as amostras de pelo (CT médio = 20,8; DP = 2,4) apresentaram uma variação de CT maior quando comparadas com as amostras de sangue (CT médio = 21,4; DP = 0,9). O teste proposto foi capaz de detectar DNA mitocondrial bovino apresentando alta sensibilidade analítica e ampla faixa linear. Novos estudos estão sendo realizados para a análise de outras amostras animais, bem como produtos para consumo como rações e suplementos.