

## PADRONIZAÇÃO DE UM TESTE DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR UTILIZANDO SONDAS TAQMAN® PARA A DETECÇÃO DO GENE DO HALOTANO EM SUÍNOS

PETRY, Bruna<sup>1</sup>; IBELLI, Adriana Mércia Guaratini<sup>2</sup>; PEIXOTO, Jane de Oliveira<sup>2</sup>; ZANELLA, Ricardo<sup>2,4</sup>; FIGUEIREDO, Elsie Antonio Pereira de<sup>2</sup>; LEDUR, Mônica Corrêa<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Universidade do Oeste de Santa Catarina, campus Joaçaba, SC. <sup>2</sup>Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC. <sup>3</sup>Bolsista PIBIC/CNPq Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC. <sup>4</sup>Bolsista BJT/CNPq.

bruuna\_petry@yahoo.com.br

A hipertermia maligna é uma doença muscular hereditária conhecida como síndrome do estresse dos suínos (PSS), causada por vários fatores como estresse físico, calórico, castração, brigas entre animais, vacinação e, inclusive, a administração do anestésico halotano que desencadeia a morte de suínos afetados (homozigotos recessivos). Por isso, o gene responsável por essa desordem é chamado de gene do halotano (HAL). Quando portador dessa síndrome, o animal apresenta uma mutação do tipo SNP causal no gene receptor de rianodina1, ocorrendo troca de uma citosina, em animais normais, por uma timina, em animais afetados. A alteração nesse receptor produz maior liberação de cálcio, aumentando as contrações musculares e a liberação de ácido láctico, desenvolvendo a carne PSE (exsudativa, pálida e mole). Essa carne não tem boa aceitação no mercado por possuir características indesejáveis como alta perda de água, além de gerar prejuízos para as indústrias alimentícias. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi padronizar um teste de diagnóstico do gene HAL em suínos utilizando sondas Taqman®, como uma alternativa ao teste de diagnóstico clássico utilizado (PCR-RFLP). Foram realizadas extrações de DNA do tecido de 36 amostras de suínos. Após, as amostras foram submetidas a um teste utilizando a metodologia convencional de PCR-RFLP; os resultados foram analisados e armazenados. Para a metodologia de discriminação alélica, foi utilizada a técnica de PCR em tempo real (qPCR), na qual foram desenhados dois *primers* e duas sondas Taqman® (Life Technologies), uma para o alelo C e outra para o alelo T. As reações de qPCR foram realizadas em equipamento 7500SDS (Applied Biosystems) utilizando para uma reação final de 15 µL: Mastermix TaqMan® Genotyping Master Mix na concentração final 1X; 0,75 µL de ensaio 20x do HAL (Custom TaqMan® SNP Genotyping Assays), contendo sondas e *primers* simultaneamente); 1 µL de DNA (25 ng/µL) e água deionizada livre de DNases e RNases para completar a reação. Ela foi colocada no equipamento de PCR Tempo Real com a ciclagem: 50 °C por 2 minutos; e 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto. Para verificar a especificidade do teste, as mesmas amostras genotipadas para o teste clássico de PCR-RFLP foram utilizadas nos ensaios de qPCR. Das 36 amostras genotipadas por qPCR, foram observados os 3 genótipos possíveis (animais normais, portadores e afetados), demonstrando especificidade das sondas. Além disso, quando os genótipos encontrados pelas duas metodologias foram comparados, houve uma concordância de 100% entre os dois testes. Dessa maneira, pode-se concluir que o teste utilizando a tecnologia de sondas Taqman® e de PCR em tempo real pode substituir a técnica PCR-RFLP no diagnóstico do gene do halotano em suínos, por possuir a mesma precisão e eficiência que a antiga técnica empregada e em um menor período de tempo.

Palavras-chave: Halotano. Suínos. Taqman®.