

## VII Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal São Carlos, SP, 10 e 11 de julho de 2008

### Detecção de polimorfismo na região promotora do gene TFAM em animais da raça Nelore<sup>1</sup>

Denise Rocha Ayres<sup>2</sup>, Lucia Galvão de Albuquerque<sup>3</sup>, Maria Eugenia Zerlotti Mercadante<sup>4</sup>, Humberto Tonhati<sup>3</sup>, André Luiz Ferreira Lima<sup>5</sup>, Monyka Marianna Massolini Laureano<sup>5</sup>, Gregório Miguel Ferreira de Camargo<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Projeto Financiado pela FAPESP

<sup>2</sup>Mestranda em Genética e Melhoramento Animal, FCAV/Unesp - Jaboticabal/SP, e-mail: [d.ayres@ig.com.br](mailto:d.ayres@ig.com.br)

<sup>3</sup>Professor adjunto, Departamento de Zootecnia, FCAV/Unesp - Jaboticabal/SP, e-mail: [lgalb@fcav.unesp.br](mailto:lgalb@fcav.unesp.br)

<sup>4</sup>Pesquisadora da EEZS, IZ/APTA/SAA, Sertãozinho/SP, e-mail: [mercadante@iz.sp.gov.br](mailto:mercadante@iz.sp.gov.br)

<sup>5</sup>Doutorando em Genética e Melhoramento Animal, FCAV/Unesp - Jaboticabal/SP, e-mail:

[murotte@hotmail.com](mailto:murotte@hotmail.com)

<sup>6</sup>Graduando em Zootecnia, FCAV/Unesp – Jaboticabal/SP, e-mail: [gregoriocamargo@hotmail.com](mailto:gregoriocamargo@hotmail.com)

**Resumo** – O objetivo do presente estudo foi detectar a presença de polimorfismos no gene TFAM em 188 animais pertencentes ao Instituto de Zootecnia de Sertãozinho. Foram analisados três grupos de animais da raça Nelore separados em três linhas de seleção, sendo duas delas selecionadas para peso ao ano (machos) e ao sobreano (fêmeas) (NeS e NeT) e uma linha controle (NeC), em que os animais são selecionados para as médias desses pesos. O DNA genômico foi extraído a partir do sangue dos animais, seguindo-se a amplificação do fragmento analisado e a digestão com a enzima de restrição *HaeIII*. Foi possível observar, pela análise de PCR-RFLP com a enzima utilizada, polimorfismo no fragmento estudado. Assim, verificou-se a presença de três genótipos para enzima *HaeIII*.

**Palavras-chave:** polimorfismo, TFAM, Nelore, marcadores moleculares.

### Detection of polymorphism at promoter region of TFAM gene in Nelore cattle

**Abstract** – The objective of this study was to detect the presence of polymorphisms in TFAM gene in 188 animals from Sertãozinho Experimental Station. Three groups of Nelore animals were separated in three selection lines, two of them selected for year (males) and yearling (females) weight (NeS and NeT) and a control line (NeC), where the animals are selected to the weight average. The genomic DNA was extracted from the animal's blood, followed by amplification of the analyzed fragment, and digestion by *HaeIII* restriction enzyme. It was possible to observe, by PCR-RFLP analysis, polymorphism in studied fragment. It was verified the presence of three genotypes to *HaeIII* enzyme in the evaluated animals.

**Keywords:** polymorphism, TFAM, Nelore, molecular markers.

## Introdução

O avanço das técnicas de biologia molecular tornou possível o estudo mais detalhado de genes envolvidos na determinação de características quantitativas, o que pode proporcionar maiores avanços nos programas de melhoramento genético, por meio do uso de seleção assistida por marcadores. A busca por estes marcadores moleculares baseia-se na identificação de polimorfismos localizados em genes estruturais, responsáveis pela manifestação de características de importância econômica. Nesse contexto, o fator de transcrição mitocondrial A (TFAM) torna-se importante, pois é uma proteína codificada nuclearmente que regula o processo inicial da transcrição e da replicação do DNA mitocondrial (mtDNA), ou seja, participa da biogênese mitocondrial. Estudos indicam que este processo está associado com a deposição de gordura, o que tornaria esse gene um possível marcador molecular para a característica de deposição de gordura subcutânea (Jiang et al., 2005). Dentro desse contexto, o objetivo do presente estudo foi verificar a existência de polimorfismo no gene TFAM em animais da raça Nelore para que, em estudos posteriores, os genótipos identificados sejam relacionados com características de carcaça.

## Material e Métodos

Foram coletadas amostras de sangue de 188 animais da raça Nelore divididos em três linhas de seleção desenvolvidas pelo Instituto de Zootecnia de Sertãozinho: 66 pertencentes ao grupo seleção (NeS), 92 pertencentes ao grupo tradicional (NeT) e 30 animais pertencentes ao grupo controle (NeC). Os animais dos grupos NeS e NeT são selecionados para peso a 1 ano de idade (machos) e ao sobreano (fêmeas). Já no grupo NeC, são selecionados machos e fêmeas com diferencial de seleção nulo, e a seleção é aplicada para a média desses pesos.

Coletaram-se 5mL de sangue de cada animal, por punção da veia jugular, utilizando-se de tubos vacutainer contendo 7,5 mg de EDTA.

Das amostras de sangue, o DNA genômico foi extraído conforme metodologia descrita por Zadworny & Kuhnlein (1990), que consiste na remoção dos eritrócitos por sucessivas lavagens com tampão salino, contendo detergente sódio-dodecilsulfato (SDS; 0,5%) com subsequente lise e precipitação das proteínas dos leucócitos em NaCl (6M). Para a precipitação do DNA foi utilizado etanol absoluto e, subsequentemente, etanol 70%. O DNA foi ressuspensionado em tampão TE (10 mM Tris HCl pH 7,6 e 1 mM EDTA pH 8,0) na proporção de 10:1 e armazenado a 4°C.

Para a análise da qualidade e quantidade do DNA extraído, cerca de 3 µL desta solução foi submetida à eletroforese em gel de agarose (1%) preparado com tampão TBE na concentração de 1X (Tris-HCl 89 mM, EDTA 2,5 mM e Ácido Bórico 89 mM pH 8,3) e brometo de etídeo (0,05 µg/mL).

A região do gene TFAM (GenBank NM\_001034016) analisada foi amplificada por reação em cadeia de polimerase (PCR) preparada em volume final de 25 µL, constituída por cerca de 100 ng de DNA, 1,5 pmol de cada primer ou iniciador, tampão de PCR (10 mM Tris-HCl pH 9,0, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> e 50 mM KCl) na concentração de 1X, 100 µM de dNTPs e 0,5 U de Taq DNA polimerase. Os iniciadores utilizados para a amplificação apresentam as seguintes seqüências: 5'-TGTAACGACGGCCAGTGTGTTGCAGAAATCAGCTAAAATG-3' (primer forward) e 5'-CAGGAAACAGCTATGACCCATCCACTGAGACTATCGCTGACCT-3' (primer reverse). A reação de amplificação foi realizada em termociclador com o seguinte

programa: desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos, 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 45 segundos, anelamento a 55,7°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos. A extensão final foi a 72°C por 10 minutos.

O fragmento do gene amplificado foi analisado por meio da técnica de PCR-RFLP, com a enzima de restrição *HaeIII*. A digestão dos fragmentos amplificados foi realizada em termociclador a 37°C por 2 horas.

Após a digestão, os fragmentos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (4%), em tampão TBE 1X com brometo de etídio a 100V, por aproximadamente 2 horas. A visualização das bandas foi feita sob luz ultravioleta (UV) e o gel, fotodocumentado em aparelho Gel Logic (KODAK).

### Resultados e Discussão

O fragmento do gene obtido pela técnica de PCR foi de aproximadamente 801 pb (Figura 1).

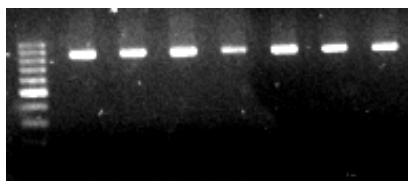


Figura 1. Eletroforograma de confirmação dos produtos amplificados do gene TFAM, mostrando o padrão de migração do fragmento de 801 pb em gel de agarose, com marcador 1Kb plus DNA Ladder.

Após a digestão pela endonuclease de restrição *HaeIII*, foi observada a presença dos genótipos AA, CA e CC assim como descrito por Jiang et al. (2005) em estudos com animais *Bos taurus*. Todos os genótipos observados apresentaram sítios de corte para a endonuclease de restrição sendo o genótipo AA representado por três fragmentos (152, 187 e 462 pb), o genótipo CA representado por cinco fragmentos (83, 104, 152, 187 e 462 pb) e o genótipo CC representado por quatro fragmentos (83, 104, 152 e 462 pb) como observado na Figura 2.

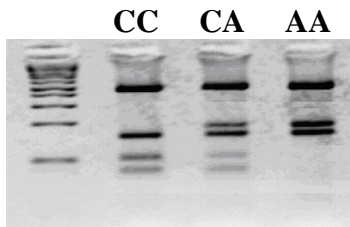


Figura 2. Eletroforograma da digestão do fragmento do gene TFAM pela endonuclease de restrição *HaeIII*, mostrando o padrão de migração dos fragmentos em gel de agarose 4%.

As freqüências genótípicas observadas para os genótipos AA, CA e CC no presente trabalho foram, respectivamente, de 0,82, 0,16 e 0,02 (Tabela 1), sendo que para todos os grupos analisados a freqüência do genótipo AA foi superior. O genótipo CC, que em *B. taurus* foi associado à maior deposição de gordura e marmoreio da carne, foi observado com uma freqüência de 0,03 apenas no grupo NeS.

Tabela 1. Frequência genotípica do gene TFAM observada nos três grupos de seleção (NeC, NeS e NeT) e frequência genotípica observada no total de animais.

Genótipos	NeC	NeS	NeT	TOTAL (188 ANIMAIS)
AA	0,73	0,76	0,90	0,82
AC	0,27	0,21	0,10	0,16
CC	-	0,03	-	0,02

Jiang et al. (2005), em um estudo para associação desse RFLP - *HaeIII* no gene TFAM com características de marmoreio e deposição de gordura subcutânea em animais F2 (Wagyu x Limousin), encontrou três genótipos AA, CA e CC com frequências de 0,18, 0,50 e 0,32, respectivamente. Esses autores conseguiram associar o polimorfismo observado C/A com as características de marmoreio e deposição de gordura subcutânea na população estudada, sendo que, a maior deposição de gordura foi associada com a presença do alelo C.

Segundo Casas et al. (2003), a identificação de marcadores relacionados com características como a composição de carcaça e a qualidade de carne permite a avaliação dos animais sem que seja necessário o abate dos mesmos, através da genotipagem dos indivíduos. Dessa forma, o resultado observado nas análises deste trabalho sugere a necessidade de futuras pesquisas para determinar a possibilidade de associações do polimorfismo observado com medidas de carcaça para *Bos indicus*.

### Conclusões

Pela técnica de PCR-RFLP, com a utilização da enzima *HaeIII*, foi observada a presença de polimorfismo para o fragmento do gene do TFAM em animais da raça Nelore.

### Literatura Citada

- CASAS, E.; SHACKELFORD, S.D.; KEELE, J.W.; KOOHMARAIE, M.; SMITH T.P. L.; STONE, T.R. Detection of QTL for growth and carcass composition in cattle. **Journal of Animal Science**, v.81, p.2976-2983, 2003.
- JIANG, Z.; KUNEJ, T.; MICHAL, J.J.; GASKINS, C.T.; REEVES, J.J.; BUSBOOM, J.R.; DOVC, P.; WRIGHT JR, R.W. Significant associations of the mitochondrial transcription factor A promoter polymorphism with marbling and subcutaneous fat depth in Wagyu x Limousin F2 crosses. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.334, p.516-523, 2005.
- ZADWORNÝ, D.; KUHNLEIN, U. The identification of kappa-casein genotype in Holstein dairy cattle using the polymerase chain reaction. **Theoretical and Applied Genetics**, v.80, p.631-634, 1990.