



**VII Simposio Brasileiro de Melhoramento Animal**  
**São Carlos, SP, 10 e 11 de julho de 2008**

**Caracterização de padrão de migração da região promotora do gene da enzima Stearoyl-CoA-Desaturase em *Bubalus bubalis***

Gregório Miguel Ferreira de Camargo<sup>1</sup>, Humberto Tonhati<sup>2</sup>, Renan Baraldi Thomazine<sup>3</sup>,  
 Lívia Boarini<sup>4</sup>, Lívia Maria Soares Ferreira<sup>3</sup>, Larissa Fernanda Simielli Fonseca<sup>3</sup>, Válter  
 Antônio Ferreira Júnior<sup>3</sup>, Denise Rocha Ayres<sup>5</sup>, André Luís Ferreira Lima<sup>5</sup>, Lúcia Galvão  
 de Albuquerque<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Acadêmico do curso de Zootecnia da FCAV/Unesp-Jaboticabal, Bolsista da FAPESP, e-mail:  
[gregoriocamargo@hotmail.com](mailto:gregoriocamargo@hotmail.com)

<sup>2</sup>Professor Adjunto do Departamento de Zootecnia da FCAV/Unesp-Jaboticabal

<sup>3</sup>Acadêmico do curso de Zootecnia da FCAV/Unesp-Jaboticabal

<sup>4</sup>Acadêmica do curso de Biologia da UNIARA

<sup>5</sup>Pós-graduando do Programa de Genética e Melhoramento Animal da FCAV/Unesp-Jaboticabal

**Resumo** – A enzima Stearoyl-CoA-Desaturase (SCD) é responsável pela síntese endógena de Ácido Linoléico Conjugado (CLA) na glândula mamária. O CLA é importante na saúde humana auxiliando no tratamento de doenças como diabetes I e II, doenças coronárias e hipertensão, além de prevenção de algumas doenças neurológicas. O intuito desse trabalho foi tentar identificar diferenças genéticas na região promotora do gene da enzima SCD entre as búfalas leiteiras. Entretanto, a aplicação da técnica de PCR-RFLP com emprego da enzima de restrição Alu I evidenciou ausência de polimorfismo para o sítio de restrição da mesma.

**Palavras-chave:** Alu I, CLA, PCR-RFLP, região promotora, Stearoyl-CoA-Desaturase

**Pattern of migration's characterization of the promoter region of the gene of the enzyme Stearoyl-CoA-Desaturase in *Bubalus bubalis***

**Abstract** – The enzyme Stearoyl-CoA-Desaturase (SCD) is the responsible for the endogenous synthesis of the Conjugated Linoleic Acid (CLA) in the mammary gland. The CLA is important for the human health helping in diseases treatments such as diabetes I and II, heart diseases and high blood pressure and helps prevention of some neurological diseases. The aim of this work was try to identify genetic difference in the promoter region of the gene of the enzyme SCD among the bubalines. However, the use of the PCR-RFLP technique with the restriction enzyme Alu I characterized an absence of polymorphism for the restriction site of the enzyme.

**Keywords:** Alu I, CLA, PCR-RFLP, promoter region, Stearoyl-CoA-Desaturase

## Introdução

O Ácido Linoléico Conjugado (CLA) é um termo utilizado para descrever um ou mais isômeros posicionais e geométricos de um ácido graxo com 18 carbonos e duas ligações duplas. O CLA apresenta efeitos positivos na saúde humana. Estudos demonstram efeitos anticarcinogênicos do CLA em culturas “in vitro” de células cancerosas da glândula mamária (PARK *et al.*, 2000; MILLER *et al.*, 2001), próstata (PALOMBO *et al.*, 2002) e cólon (MILLER *et al.*, 2001).

Alguns autores relatam também o efeito significativo do CLA em doenças tidas como metabólicas acarretadas pela obesidade, como diabetes I e II, doenças coronárias e hipertensão (AGNIESKA e NTAMBI, 2005), além da capacitação do sistema imunológico e prevenção de algumas doenças neurológicas (MIYAZAKI e NTAMBI, 2003).

As maiores fontes naturais de CLA disponíveis para o consumo humano encontram-se em produtos oriundos de ruminantes, principalmente o leite e seus derivados. No intuito de proporcionar benefícios à saúde humana melhorando a qualidade nutricional do leite bubalino e seus derivados, assim como promover melhorias no valor econômico desses produtos, devem ser adotadas técnicas que possibilitem o incremento na produção de CLA na gordura do leite dessa espécie. Uma alternativa para tal incremento seria pela dieta dos animais, fator que mais afeta a concentração de CLA na gordura.

Entretanto, variações individuais altamente significativas (oscilando entre três e dez vezes) para o teor de CLA no leite produzido por vacas submetidas à mesma dieta, foram observadas por alguns autores (WHITE *et al.*, 2000 e PETERSON *et al.*, 2002). Isso pode indicar que há uma característica genética que influencia na quantidade de CLA produzida no leite.

A enzima Stearoyl-CoA-Desaturase (SCD) atua na glândula mamária convertendo o ácido vacênico (trans-11 C18:1) em cis-9 trans-11-CLA (um isômero biologicamente ativo do CLA) e portanto está diretamente correlacionada com a produção do ácido graxo no leite. O trabalho teve como intuito a utilização da técnica de PCR-RFLP para investigar a existência de possíveis polimorfismos na região promotora do gene da enzima SCD.

## Material e Métodos

O grupo de animais avaliado foi de 140 búfalas da raça Murrah pertencentes a três fazendas localizadas no estado de São Paulo participantes do programa de controle leiteiro de bubalinos mantidos pelo Departamento de Zootecnia da Unesp/Jaboticabal-SP.

O DNA genômico foi extraído de folículos pilosos da vassoura da cauda, utilizando-se o método Fenol-Clorofórmio-Álcool Isoamílico na proporção de 25:24:1 (PCL). Esse método consiste em submeter as amostras com os folículos (aproximadamente 40 folículos/amostra) a incubações com TE-Tween e Proteinase-K, seguidas da extração efetiva do DNA com PCL, precipitação com acetato de Sódio (0,3 M) e etanol absoluto e ressuspensão do DNA em tampão TE (10 mM Tris HCl pH = 7,6 e 1 mM EDTA pH = 8,0) na proporção de 10:1, sendo posteriormente armazenadas a 4 °C. Uma alíquota de 10 µL da solução de cada amostra do DNA genômico será diluída com 5 µL de tampão de corrida (0,05% de azul de bromofenol) e foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (0,8%), em tampão TBE 1X (Tris-HCl 89 mM; EDTA 2,5 mM e Ácido Bórico 89 mM e pH 8,3) com brometo de etídio (0,05 µg/mL) a 70 V, por aproximadamente 50 minutos. A visualização do DNA genômico foi feita em luz ultravioleta (UV) e o gel fotodocumentado em aparelho Gel-Doc (Bio-Rad), visando quantificar a concentração e pureza do DNA.

As amostras de DNA genômico tiveram a região promotora da SCD amplificadas por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), em reações contendo 100 ng de DNA, 0,5  $\mu\text{M}$  de cada *primer* (5' AGTTCCTTGCTTCTTCGG 3' e 5'GTTGGAGACCTAAGTTTGC 3'), 1X PCR *buffer* [10 mM Tris-HCl (pH 9,0), 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$  e 50 mM KCl], 100  $\mu\text{M}$  de dNTPs e 0,5 U de Taq polimerase num volume final de 25  $\mu\text{l}$ .

A reação de amplificação foi realizada, a princípio de acordo com a seguinte programação: o primeiro passo é de 95 °C por cinco minutos, o segundo passo é de 95 °C por um minuto, o terceiro passo é de 62 °C por um minuto o quarto é de 72°C por um minuto, repetidos do segundo ao quarto passo por 35 vezes, após isso segue-se incubação a 72°C por cinco minutos e então as amostras são mantidas a 4°C. Após a amplificação, uma alíquota de 3  $\mu\text{l}$  de cada amostra foi diluída com 2  $\mu\text{l}$  de tampão de corrida (0,05% de azul de bromofenol) e foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (1,5%), em tampão TBE 1 X (Tris-HCl 89 mM; EDTA 2,5 mM e Ácido Bórico 89 mM e pH 8,3) com brometo de etídio (0,05  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) a 70 V, por aproximadamente 50 minutos. A visualização foi feita em luz UV e o gel foi fotodocumentado em aparelho Gel-Doc (Bio-Rad), visando avaliar a especificidade da PCR em função do tamanho do fragmento amplificado.

Depois, realizou-se a técnica de Polimorfismo do Comprimento do Fragmento de Restrição (RFLP), em que o fragmento foi digerido durante uma hora a 37 °C no termociclador, utilizando-se 8  $\mu\text{l}$  da reação de amplificação, cinco unidades das enzimas de restrição Alu I e 1/10 de tampão para a enzima de restrição em um volume final de 20  $\mu\text{l}$ . Em seguida, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (2,0%), com tampão TBE 1X (Tris-HCl 89 mM; EDTA 2,5 mM e Ácido Bórico 89 mM e pH 8,3) e brometo de etídio (0,05  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) por aproximadamente duas horas a 100 volts. A visualização foi feita em luz UV e o gel foi fotodocumentado em aparelho Gel-Doc (Bio-Rad), visando avaliar o padrão de migração das amostras.

### Resultados e Discussão

O padrão de migração observado pela clivagem da enzima Alu I foi o mesmo para todos os animais resultando em dois fragmentos: um fragmento possui aproximadamente 400 pb e o outro entre 200 pb e 100 pb.

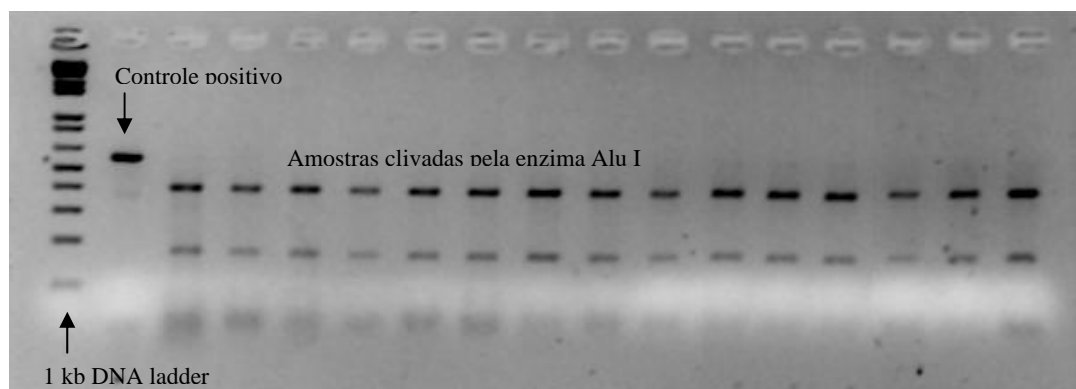


Figura 1 - Padrão de migração do fragmento da região promotora do gene da enzima Stearoyl-CoA-Desaturase e clivado com a enzima de restrição Alu I.

Foram feitas reações de contra prova para todas as amostras e os padrões de migração se repetiram, evidenciando a ausência de polimorfismo na amostra estudada.

### Conclusões

Os resultados obtidos permitem inferir que não foram encontrados polimorfismos na região promotora do gene da enzima Stearoyl-CoA-Desaturase com a utilização da técnica de PCR-RFLP e enzima de restrição Alu I na espécie *Bubalus bubalis*.

### Literatura Citada

- AGNIESZKA D.; NTAMBI, J.M. The role of stearoyl-CoA desaturase in the control of metabolism **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v.73, n.1, p.35-41, 2005.
- MILLER, A.; STANTON, C.; DEVERY, R. Modulation of arachidonic acid distribution by conjugated linoleic acid isomers and linoleic acid in MCF-7 and SW480 cancer cells. **Lipids**, v.36, n.10, p.1161-1168, 2001.
- MIYAZAKI, M.; NTAMBI, J. N. Role of stearoyl-coenzyme A desaturase in lipid metabolism. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v.68, n.2, p.113-121, 2003.
- PALOMBO, J.D.; GANGULY, A.; BISTRAN, B.R. *et al.* The antiproliferative effects of biologically active isomers of conjugated linoleic acid on human colorectal and prostatic cancer cells. **Cancer Letters**, v.177, n.2, p.163-172, 2002
- PARK Y., ALLEN K.G.D., SHULTZ T.D.- Modulation of MCF-7 breast cancer signal transduction by linoleic acid in culture. **Anticancer Research**, v.20, n.2A, p.669-676, 2000.
- PETERSON, D.G., KELSEY, J. A., BAUMAN, D. E., Analysis of variation in cis-9 trans-11 conjugated linoleic acid in milk fat of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.85, n.9, p.2164-2172, 2002.
- WHITE, S.L.; BERTRAND, J.A.; WADE, M.R. *et al.* Comparison of fat acid content of milk from Jersey and Holstein cows consuming pastures or a total mixed ration. **Journal of Dairy Science**, v.84, n.10, p.2295-2301, 2001.