



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

Identificação de polimorfismos por PCR-RFLP no gene da enzima Stearoyl-CoA-Desaturase em *Bubalus bubalis* utilizando-se a endonuclease de restrição Hae-III

Renan Baraldi Thomazine¹, André Luís Ferreira Lima⁵, Humberto Tonhati², Livia Boarini⁴,
 Válder Antônio Ferreira Júnior³, Denise Rocha Ayres⁵, André Luís Ferreira Lima⁵, Lúcia
 Galvão de Albuquerque², Gregório Miguel Ferreira de Camargo⁶

¹Acadêmico do curso de Zootecnia da FCAV/Unesp-Jaboticabal, Bolsista da FAPESP, e-mail:
 thomazine.rb@hotmail.com

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

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

⁴Acadêmica do curso de Biologia da UNIARA

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

⁶Acadêmico do curso de Zootecnia da FCAV/Unesp-Jaboticabal, Bolsista da FAPESP, e-mail:
gregoriocamargo@hotmail.com

Resumo – O consumo de alimentos que contenham Ácidos Linoléicos Conjugados (CLA) proporciona efeitos benéficos na prevenção e tratamento de várias doenças, dentre elas, o câncer. A principal fonte de CLA disponível para o consumo humano está presente na gordura do leite e de produtos lácteos derivados de ruminantes. A síntese endógena de CLA nestes animais ocorre na glândula mamária, sob a ação da Stearoyl-CoA-Desaturase (SCD). Entretanto, pouco se sabe em relação à atividade desta enzima nos bubalinos (*Bubalus bubalis*). Considerando possíveis variações genéticas entre animais, quanto à capacidade de sintetizar CLA, o objetivo do presente trabalho foi utilizar a técnica de PCR-RFLP para identificar a possível existência de polimorfismos no gene da SCD. Com o auxílio deste marcador molecular, pretende-se incrementar a produção de CLA, fazendo uso de ferramentas que permitam realizar a seleção de animais com genótipos favoráveis para o aumento de CLA no leite. Dessa forma, promovendo ganhos genéticos adicionais, com o intuito de trazer benefícios à saúde humana e proporcionar melhor retorno econômico à pecuária leiteira.

Palavras-chave: Ácidos Linoléicos Conjugados, bubalinos, gordura do leite, marcador molecular, PCR-RFLP

Identification of polymorphism by PCR-RFLP in the gene of the enzyme Stearoyl-CoA-Desaturase in *Bubalus bubalis* using the restriction enzyme Hae-III.

Abstract – The intake of food which contain Conjugated Linoleic Acids (CLA) provide health benefit and can also act in the prevention and treatment of many diseases such as cancer. The principal source of CLA for humans is the ruminant's milk and the products

derived from it. The CLA's endogenous syntheses in these animals occur in the mammary gland, under the action of the enzyme Stearoyl-CoA-Desaturase (SCD). However, little is known about the activity of this enzyme in bubaline (*Bubalus bubalis*). Genetic variation could exist in these animals and it should influence the quantity of CLA in milk. The aim of this work was to use the PCR-RFLP technique to verify the existence of polymorphism in the gene of SCD. The use of this molecular marker has the intention to increase the CLA production, selecting genotypes that are correlated with a higher quantity of CLA in milk. By this way, promoting genetic gain, improving the human health and obtaining a higher profitability to the breeder.

Keywords: Conjugated Linoleic Acids, bubaline, fat milk, molecular marker, PCR-RFLP

Introdução

A síntese endógena de Ácidos Linoléicos Conjugados (CLA) em ruminantes ocorre na glândula mamária, sob a ação da enzima Stearoyl-Coa-Desaturase (SCD). O objetivo foi verificar a possível existência de polimorfismos no gene dessa enzima em búfalas leiteiras (*Bubalus bubalis*), utilizando o método de PCR-RFLP (Reação em Cadeia de Polimerase – Polimorfismo do Comprimento do Fragmento de Restrição).

Material e Métodos

Devido existência de um alto grau de similaridade entre o cDNA da SCD de mamíferos, variando de 95% a 98% entre caprinos, bovinos, suínos, humanos, camundongos e ovinos (REN et al, 2003; BERNARD *et al.* 2001; CHUNG *et al.*, 2000), foram sintetizados inicialmente, 1 par de iniciadores para as reações de PCR descritos por BERNARD *et al.* (2001). As seqüência do par de oligonucleotídeos inicial foi:

E► (forward) > 5'-CGAGCTAGATATATGACAGAATC - 3'
P◄ (reverse) > 5' – GCCAACCCACGTGAGAAGA – 3'

O DNA genômico foi extraído da fase leucocitária, conforme metodologia descrita por Zadworny & Kuhnlein (1990). Após a extração, as amostras de 150 búfalas foram amplificadas por PCR, resultando em um fragmento de 1600 pb referente ao gene da Stearoyl-Coa-Desaturase. As reações foram realizadas em um volume final de 25 µL, contendo 100 ng de DNA, 0,5 µM de cada iniciador, denominados Z e D1, 1X PCR “buffer” [(10 mM Tris-HCl) (pH 9,0)], 1,5 mM MgCl₂ e 50 mM KCl], 100 µM de dNTP e 0,5 U de Taq DNA polimerase. O produto amplificado foi então digerido utilizando-se 8 µL da reação de PCR de cada amostra, 2 µL de tampão 10X e 0,5 µL da endonuclease de restrição Hae III, em um volume final de 20 µL. Em seguida as amostras foram levadas ao termociclador por 1 hora a 37°C, logo após esse período foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (1,5%), 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 µg/mL) por aproximadamente duas horas. As bandas foram visualizadas sob luz ultravioleta (UV) e fotodocumentadas em aparelho Gel -Logic (Kodak). As frequências gênicas (xi) para o alelo da região promotora do gene da SCD (i), e genotípicas para o genótipo (ii), foram estabelecidas para a população, pelas Equações 1 e 2:

$$x_i = \frac{2n_{ii} + \sum n_{ii}}{2n} \quad [\text{Eq. 1}]$$

$$x_{ii} = \frac{n_{ii}}{n} \quad [\text{Eq. 2}]$$

Em que n_{ii} e n_{ij} correspondem ao número de homozigotos e heterozigotos observados no alelo i , respectivamente; n corresponde ao número de indivíduos analisados.

Pelo teorema de Hardy-Weinberg, as frequências genóticas esperadas, em equilíbrio, podem ser estimadas a partir da expansão do binômio:

$$(x_i + x_j)^2 = x_i^2 + 2x_ix_j + x_j^2 \quad [\text{Eq. 3}]$$

Em que x_i^2 = frequência esperada dos homozigotos para o alelo i ; $2x_ix_j$ = frequência esperada para heterozigotos ij ; x_j^2 = frequência esperada dos homozigotos para o alelo j . Para testar a aderência das frequências observadas ao equilíbrio de Hardy-Weinberg foi utilizado o teste de χ^2 .

Resultados e Discussão

Foram realizados testes preliminares de PCR objetivando-se a otimização das quantidades de reagentes e da temperatura ideal para a amplificação dos fragmentos obtidos com o par de iniciadores E► ◀P. Todas as reações envolvendo o referido par e suas respectivas temperaturas de anelamento proporcionaram êxito na obtenção dos produtos da PCR, amplificando o fragmento de aproximadamente 1,6 Kb. Após estas reações, as amostras contendo os produtos da PCR foram mantidas a -20°C .

A reação de digestão do fragmento E► ◀P pela enzima Hae-III originou, em 150 amostras 6 padrões de migração diferentes: os genótipos CC, AC, AB, BB, AA, BC, que podem ser observados na figura 1. A diferença do número e tamanho dos fragmentos de DNA, comparando-se as amostras indica o polimorfismo desta região do gene da SCD na espécie bubalina.

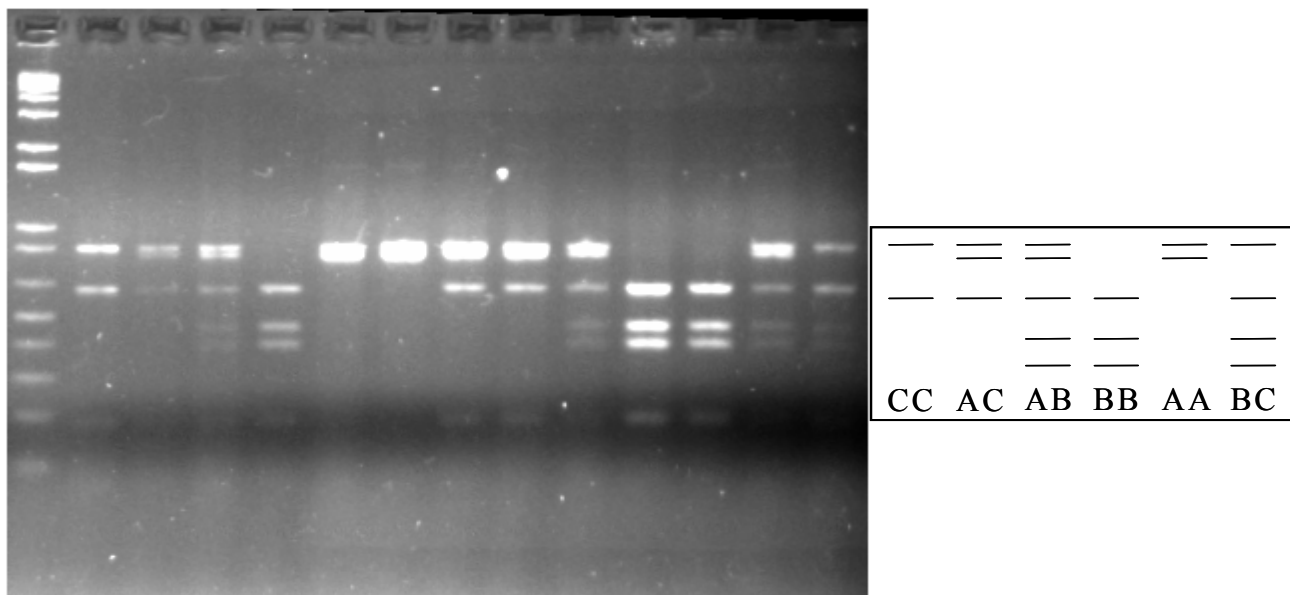


Figura 1 - Padrão de bandeamento das amostras e eletroforograma da reação de PCR-RFLP com a enzima de restrição Hae-III na região amplificada por E► ◀P.

As frequências gênicas e genótípicas foram estimadas por contagem simples dos genótipos visualizados na eletroforese (Figura 1). Foram feitas reações de contraprova para todas as amostras e os padrões de migração se repetiram evidenciando a detecção do polimorfismo. As frequências obtidas para esta região do gene da SCD nos animais avaliados nesse estudo estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Frequências gênicas e genótípicas da região da SCD obtidas com o uso da técnica de PCR-RFLP.

Técnica	N	Frequência alélica			Frequência genotípica					
		A	B	C	AA	AB	BB	CC	BC	AC
PCR-RFLP	141	0,54	0,38	0,08	0,26	0,46	0,13	0,01	0,05	0,09

As frequências genótípicas esperadas foram 0,285 para o genótipo AA, 0,408 para o genótipo AB e 0,15 para o genótipo BB, 0,007 para o genótipo CC, 0,064 para o genótipo BC, 0,089 para o genótipo AC. As frequências observadas aderem ao teorema de Hardy-Weinberg quando comparadas com as esperadas pelo teste do χ^2 ao nível de 1%, pois o valor de $\chi^2_{obs} < \chi^2_c$. Portanto, a população está em equilíbrio.

Conclusões

A técnica de PCR-RFLP utilizando-se a endonuclease de restrição Hae-III foi eficiente na detecção de polimorfismos no gene da enzima Stearoyl-CoA Desaturase na espécie *Bubalus bubalis*.

Literatura Citada

- BERNARD, L.; LEROUX, C.; HAYES, H.; GAUTIER, M.; CHILLIARD, Y.; MARTIN, P. Characterization of the caprine stearoyl-CoA desaturase gene and its mRNA showing an unusually long 3'-UTR sequence arising from a single exon. **Gene**, v.281, p.53-61, 2001.
- CHUNG, M.; HA, S.; JEONG, S.; BOK, J.; CHO, K.; BAIK, M.; CHOI, Y. Cloning and characterization of bovine stearoyl-CoA desaturase 1 cDNA from adipose tissues. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v.64, p.1526-1530, 2000.
- REN, J.; KNORR, C.; HABERMANN, F.; FRIES, R.; HUANG, L.S.; BREINIG, B. Assignment of the porcine stearoyl-CoA desaturase (SCD) gene to SSC14q27 by fluorescence in situ hybridization and by hybrid panel mapping. **Animal Genetics**, v.34, p.465-476, 2003.
- ZADWORNÝ, D.; KUHLEIN, U. The identification of the kappa-casein genotype in Holstein dairy cattle using the polymerase chain reaction. **Theoretical and Applied Genetics**, v.80, p.631-634, 1990.