

X Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal Uberaba, MG – 18 a 23 de agosto de 2013

Caracterização do gene Stearoil-CoA desaturase nas raças Gir e Guzerá

Ana Cláudia de Freitas¹, Gabriela Fernanda Souza², Gregório Miguel Ferreira de Camargo³, Maria Gabriela Campolina Diniz Peixoto⁴, Maria Raquel Santos Carvalho⁵, Humberto Tonhati⁶

¹ Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento Animal – UNESP, Jaboticabal - SP. Bolsista do CNPq. e-mail: anafreitas.unesp07@gmail.com

² Curso de Zootecnia – UNESP/Jaboticabal - SP

³ Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento Animal – UNESP, Jaboticabal - SP

⁴ Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora - MG

⁵ Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG, Belo Horizonte - MG

⁶ Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, Jaboticabal - SP

Resumo: A enzima Stearoyl-CoA desaturase (SCD) é responsável pela síntese endógena de Ácido Linoléico Conjugado (CLA), que está relacionada à prevenção e tratamento de doenças como diabetes tipo I e II, câncer, doenças coronarianas e hipertensão em humanos. O intuito desse trabalho foi verificar variantes do gene da enzima SCD, através de uma varredura por polimorfismos nos 6 exons que o compõem em 23 animais das raças Gir e 21 animais da raça Guzerá. Com a utilização da técnica de sequenciamento, foram encontrados dois polimorfismos na raça Gir e seis na raça Guzerá, sendo um desses não-conservativo (g.10329T>C). Os resultados sugerem que os polimorfismos identificados podem ser utilizados como marcadores genéticos para melhorar o desempenho da produção de leite em zebuínos, porém, posteriores estudos são necessários a fim de que se consiga uma associação destes com os níveis de CLA no leite.

Palavras-chave: CLA, produção de leite, SNP, zebu

Characterization of Stearoil-CoA desaturase gene in Gir and Guzerá breed

Abstract: Stearoyl-CoA-Desaturase (SCD) catalyzes the endogenous synthesis of the Conjugated Linoleic Acid (CLA) in the mammary gland. CLA helps prevention and treatment of diabetes I and II, heart diseases and high blood pressure. The aim of this work was to find genetic polymorphisms in the SCD gene through a scanning for polymorphisms in the 6 exons that composing this gene in 23 animals Gir and 21 Guzerá. By sequencing, two polymorphisms in Gir and six in Guzerá were found, one of them non-conservative (g.10329T>C). The results suggest that the identified polymorphisms may be used as genetic markers to enhance production performance of milk in Zebu cattle, but further studies are needed to ascertain the association of these polymorphisms and CLA levels in bovine milk.

Keywords: CLA, milk yield, SNP, zebu

Introdução

O Stearoyl-CoA-Desaturase (SCD) é um complexo multifuncional enzimático importante na biossíntese celular de ácidos graxos (Alim et al. 2012), que atua na glândula mamária convertendo o ácido vacênico (trans-11 C18:1) em cis-9 trans-11-CLA, um isômero biologicamente ativo do Ácido Linoléico Conjugado (CLA). O CLA tem um efeito benéfico em seres humanos devido as suas propriedades preventivas a doenças metabólicas como diabetes II, doenças coronárias e hipertensão (Agnieska & Ntambi, 2005). A gordura do leite e derivados lácteos são as principais fontes de CLA na dieta humana, o que confere ao leite bovino propriedades nutracêuticas. As variações na alimentação e no sistema de produção dos bovinos exercem influência sobre a concentração de CLA secretado na gordura do leite. No entanto, diferentes concentrações desse ácido graxo são observadas, mesmo em animais submetidos à igual dieta e condições de manejo. De acordo com Peterson et al. (2002), as variações entre indivíduos podem ser causadas por alterações na expressão do gene SCD na glândula mamária ou mudanças de atividade do gene geradas por mutações. Alguns estudos realizados com raças taurinas apontam polimorfismos no gene SCD, que influenciam o aumento nos níveis de produção de leite e seus constituintes (Milanesi et al. 2008; Alim et al. 2012), porém não existem trabalhos que relatem mutações desse gene em raças zebuínas. Sendo o Brasil um país de clima tropical, onde as raças zebuínas colocam o país entre os grandes produtores de alimentos, torna-se interessante a busca por ferramentas que venham a auxiliar o sistema de seleção atualmente empregado nas raças zebuínas leiteiras. Assim, esse trabalho objetivou caracterizar os seis exons descritos para o gene SCD nas raças

Guzerá e Gir, que possam ser utilizados em estudos de associação com características de importância econômica na produção de leite.

Material e Métodos

Neste estudo, fez-se o uso de amostras de sangue de 21 vacas da raça Guzerá, aleatoriamente escolhidas, criadas em propriedade localizada na região do Vale do Rio Doce, MG e 23 vacas da raça Gir, de propriedade localizada em Guapé – MG. Estas propriedades foram escolhidas por representarem criatórios com grande variabilidade genética, constatada em estudo prévio. As vacas escolhidas para estas análises pertencem às principais linhagens criadas no país. A extração de DNA foi feita a partir de sangue, seguindo o protocolo descrito por Miller et al. (1988). Posteriormente, os fragmentos contendo os seis éxons do gene SCD foram amplificados pela técnica de PCR. Uma representação esquemática da distribuição destes SNPs ao longo do gene SCD é exposta na figura 1. Os seis pares de *primers* utilizados foram retirados de Alim et al. (2012) e confeccionados de forma que se anelassem aos introns, flanqueando, assim, cada éxon. Para as reações de PCR foram utilizados 70 ng de DNA genômico, 5 μ M de cada primer, 25 μ L de Gotaq Colorless Master Mix (Promega) e água (Free nuclease) para um volume final de 50 μ L. Os ciclos de PCR de todos os fragmentos consistiram de um ciclo de desnaturação inicial a 94° C por 5 minutos, 32 ciclos consecutivos de: desnaturação a 94°C por 45 segundos; anelamento a 56°C por 40 segundos; extensão a 72°C por 45 segundos, seguidos de um ciclo de 72°C por 5 minutos para a extensão final. Os produtos amplificados pela reação de PCR foram purificados com o kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega, EUA. Após purificação, o produto de PCR foi sequenciado a partir dos dois *primers* (*forward* e *reverse*) utilizando a técnica de terminação de cadeia por dideoxynucleotídeos (ddNTPs), descrita por Sanger et al. (1977), com o ABI PRISM *BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit*, (Applied Biosystems) em um sequenciador automático ABI 3730 XL (Applied Biosystems). Para a análise e identificação dos polimorfismos, as sequências obtidas foram visualizadas com o programa CodonCode Aligner, disponível no site <http://www.codoncode.com/aligner/download.htm>. O desequilíbrio de ligação foi analisado posteriormente com o uso do software PLINK, que pode ser encontrado no link: <http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink/index.shtml>.

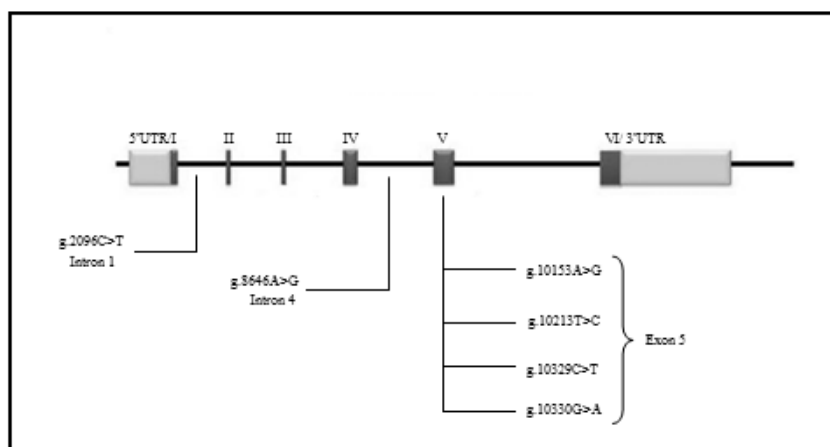
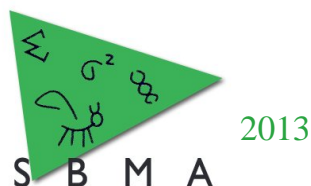


Figura 1. Estrutura do gene SCD e SNPs detectados nas raças Gir e Guzerá. Representação dos éxons (retângulos pretos), 5' e 3' UTRs (retângulos cinzas). Nomenclatura dos polimorfismos exônicos abaixo de seu respectivo éxon. Nomenclatura de polimorfismos em introns abaixo da representação estrutural do gene.

Resultados e discussão

Os fragmentos (exons) estudados foram numerados de um a seis e continham os seguintes tamanhos: Fragmento 1 com 384bp; Fragmento 2 com 552bp; Fragmento 3 com 499bp; Fragmento 4 com 594bp; Fragmento 5 com 400bp; e Fragmento 6 com 543bp. Foram identificados dois SNPs segregando



X Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Uberaba, MG – 18 a 23 de agosto de 2013

nos animais da raça Gir e seis SNPs nos animais da raça Guzerá. Os polimorfismos (SNPs) encontrados nos animais da raça Gir, estão um no intron 4 (g.8646A>G) e um no exon 5 (g.10330G>A). Nos animais da raça Guzerá, os SNPs encontrados estão em: um no intron 1 (g.2096C>T), um no intron 4 (g.8646A>G) e quatro no exon 5 (g.10153A>G, g.10213C>T, g.10329T>C e g.10330G>A), sendo o penúltimo não conservativo, resultando na mudança do aminoácido alanina por valina na proteína SCD. À exceção dos polimorfismos g.2096C>T e g.10330G>A, o primeiro encontrado apenas em animais da raça Guzerá e o segundo encontrado nas duas populações, todos os demais já haviam sido relatados por Alim et al. (2012) em taurinos (GENBANK: AY241932), sendo que apenas o polimorfismo no intron 3 (g.6926A>G), encontrado por Alim et al. 2012, não foi encontrado nos animais deste estudo. As análises de desequilíbrio de ligação, feitas através do programa PLINK, mostraram um alto desequilíbrio entre os SNPs g.8646A>G, g.10213C>T e g.10329T>C, indicando que apenas um destes poderia ser escolhido como marcador molecular em um posterior estudo com a população. Foi evidenciado ainda que, apesar da proximidade entre os SNPs g.10329T>C e g.10330G>A, o valor do desequilíbrio de ligação entre estes SNP foi baixo (0,244). De acordo com os resultados de Alim et al. (2012), houve associação significativa entre os SNPs g.8646A>G, g.10153A>G, g.10329T>C, g.10213C>T e características produtivas em taurinos. Ainda de acordo com Alim et al (2012), foi verificado que animais com genótipo heterozigoto apresentaram maiores produções de leite, gordura e proteína do que aqueles homozigotos AA, GG, CC ou TT. Vale, portanto, ressaltar que possíveis diferenças na expressão das características de produção de leite entre taurinos e zebuínos podem ser decorrentes das variantes presentes, e em maior ou menor frequência, em uma e outra raça. Para detecção de tais efeitos, no entanto, faz-se necessária a condução de estudos com amostras maiores. As sequências de nucleotídeos das duas populações foram depositadas no GENBANK KC514049 (Guzerá) e KC488884 (Gir).

Conclusões

Existem variações nos SNPs para o gene SCD nas amostras das raças Gir e Guzerá. Dois SNPs não descritos no GENBANK foram encontrados em introns e exons. Os resultados sugerem que os polimorfismos identificados podem ser utilizados como marcadores genéticos em zebuínos leiteiros, porém, mais estudos com maior número de dados se fazem necessários a fim de que se consiga uma associação destes com características de interesse econômico, principalmente em relação ao CLA.

Literatura citada

- AGNIESZKA D.; NTAMBI, J.M. The role of stearyl-CoA desaturase in the control of metabolism. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v.73, n.1, p.35-41, 2005.
- ALIM, M.A., FAN, Y.P., WU, X.P., XIE, Y., ZHANG, Y., ZHANG, S.L., SUN, D.X., ZHANG, Y., ZHANG, Q., LIU, L., GUO, G., Genetic effects of stearyl-coenzyme A desaturase (SCD) polymorphism on milk production traits in the Chinese dairy population. **Molecular Biology Reports**, v.39, p.8733-8740, 2012.
- MILANESI, E., NICOLOSO, L., CREPALDI, P. Stearyl-CoA desaturase (SCD) gene polymorphisms in Italian cattle breeds. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v.125, n.1, p.63-67, 2008.
- MILLER, A.S.; DYKES, D.D.; POLESKI, H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human cells. *Nucleic Acids Research*, n.16, p.1215, 1988.
- 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.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, v. 74, n.12, p. 5463-5467, 1977.