

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

CAMPUS DE JABOTICABAL

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E ANÁLISE DE
POLIMORFISMOS DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE DA
ENZIMA *ESTEAROIL-COENZIMA A DESSATURASE* EM
BÚFALAS LEITEIRAS.**

André Luís Ferreira Lima

Zootecnista

Jaboticabal – São Paulo – Brasil

Julho de 2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

CAMPUS DE JABOTICABAL

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E ANÁLISE DE
POLIMORFISMOS DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE DA
ENZIMA *ESTEAROIL-COENZIMA A DESSATURASE* EM
BÚFALAS LEITEIRAS.**

André Luis Ferreira Lima

Orientador: Prof. Dr. Humberto Tonhati

**Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como
parte das exigências para a obtenção do título de
Doutor em Genética e Melhoramento Animal.**

Jaboticabal – São Paulo – Brasil

Julho de 2009

L732c Lima, André Luís Ferreira
Caracterização genética e análise de polimorfismos da região promotora do gene da enzima *Estearoil-Coenzima A dessaturase* em búfalas leiteiras / André Luís Ferreira Lima. – – Jaboticabal, 2009
v, 82 f. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2009

Orientador: Humberto Tonhati

Banca examinadora: Eucléia Primo Betioli Contel, Luciana Correia de Almeida Regitano, Antonio Roberto Otaviano, Jeffrey Frederico Lui

Bibliografia

1. Búfala-ácido linoléico conjugado. 2. Leite-búfala. 3. Ácido Linoléico Conjugado-câncer. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 636.293:577.115

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Campus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ANDRÉ LUÍS FERREIRA LIMA, nascido aos 4 dias do mês de julho de 1979 na cidade de Ribeirão Preto-SP. Ingressou no curso de Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias / UNESP- Jaboticabal, em 2000. Em 2001 foi incluído no Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC/CNPq/UNESP) sob orientação do Prof. Dr. Humberto Tonhati, na área de melhoramento genético de búfalas leiteiras. Graduado em 2004, ano em que ingressou no curso de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento Animal da mesma instituição, com bolsa de mestrado fornecida pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo(FAPESP), obteve o título de Mestre em fevereiro de 2006. Em março deste mesmo ano, iniciou seu processo de doutoramento no mesmo programa de pós-graduação, também fomentado pela FAPESP. Desde agosto de 2006 integra o quadro de docentes do Centro Universitário “Barão de Mauá” – Ribeirão Preto/SP - como professor adjunto do curso de graduação em Medicina Veterinária, ministrando as disciplinas: Genética Animal e Melhoramento Genético Animal.

"Não há fé inabalável senão aquela que pode encarar a razão face a face, em todas as épocas da humanidade" - Allan Kardek

*"Não posso conhecer o desconhecido, se ao conhecido me agarro" -
Robert Fisher em: O cavaleiro preso na armadura*

Aos meus amados:

Lucila, Antonio, Bárbara

Marcelo, Fernanda, Patrícia, Giovana e Camila

*Por me fazerem sentir o verdadeiro
significado da palavra "FAMÍLIA"*

Ao meu amor, minha flor, minha vida,

Amanda

Dedico

Ao ensino público Brasileiro:
Por garantir minha formação
Intelectual e acadêmica nestes 24 anos...

Agradeço

Ao meu amigo e orientador,
Prof. Dr. Humberto Tonhati:
Por nortear minha formação científica,
Por acreditar em minha capacidade,
Por confiar em mim...

Ofereço

A Deus e a todas as almas Santas, que me iluminam e protegem;

À Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - Unesp;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo, pelo auxílio na forma de bolsa de estudos (processo: 2005 / 56445-4);

Aos animais da espécie *Bubalus bubalis*;

Aos criadores de búfalos: Maria Cecília Pacheco de Almeida Prado (Faz. Rio Pardo), Otavio Bernardes (Faz. Paineiras do Ingaí) e Wilma Penteado Ferreira (Faz. Santa Eliza), por disponibilizarem seus animais para a realização deste trabalho;

À Dra. Lúcia Galvão de Albuquerque, pela amizade e oportunidade em trabalhar com uma das mais competentes profissionais do melhoramento genético animal;

Aos integrantes da Banca de Defesa: Dra. Eucléia Primo Betioli Contel, Dra. Luciana Correia de Almeida Regitano, Dr. Antonio Roberto Otaviano e Dr. Jeffrey Frederico Lui, por disponibilizarem seu tempo em contribuição ao enriquecimento deste trabalho;

Aos integrantes da Banca do Exame Geral de Qualificação: Dr. Danísio Prado Munari, Dra. Maria Eugênia Zerlotti Mercadante e Dra. Sônia Marli Zingaretti, pelas correções em melhoria deste trabalho;

Aos meus co-orientados, Livia Boarini, Gregório Miguel Ferreira de Camargo e Renan Baraldi Thomazini. As realizações de vocês sempre serão, pra mim, motivo de muito orgulho;

Ao meu amigo Fernando Sebastian Baldi Rey, pela inestimável ajuda nas análises estatísticas.

À minha amiga Denise Rocha Ayres, uma pessoa que sempre transmite energia positiva, onde quer que esteja;

À minha amiga Luciana Shiotsuki, pelas nossas conversas que tanto aliviam nossos momentos de dificuldades;

Aos amigos de sempre e suas respectivas famílias: Ana Paula Coelho Ribeiro, Edson Lourenço Sichieri Jr, Jeanne Mendes Cattini Montrezor, Glauco Mora Ribeiro, Marcel Manente Boiago, Marcos Martins Gonzáles e Pedro Henrique Watanabe;

Aos integrantes da república "Nostravamus": João (vacilão), Madson (fiu-terra), Walter (k-raio), Víctor (cordinha), Thiago (tcheca), Thales (bundamoli), pela experiência de vida em um grupo de amigos sinceros.

Aos técnicos do laboratório de Genética e Biologia Molecular Animal: João e Paulo, por sempre me ajudarem no suporte das atividades laboratoriais;

A todos os funcionários(as) da biblioteca da F.C.A.V.;

Às Funcionárias da Seção de Pós-Graduação, por sempre me socorrerem nos momentos de necessidades;

Ao Centro Universitário Barão de Mauá, especialmente à Dra. Adriana Coelho de Souza, por acreditar em meu potencial como docente;

A todos os alunos e alunas que cursaram disciplinas por mim ministradas, permitindo assim minha contribuição em sua formação acadêmica e profissional.

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1. Considerações gerais.....	1
OBJETIVOS GERAIS.....	16
Refêrências.....	17
 CAPÍTULO 2. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE DA ENZIMA <i>Estearoil-Coenzima A Dessaturase</i> EM BÚFALAS LEITEIRAS.	
Resumo.....	28
Abstract.....	29
Introdução.....	30
Material e Métodos.....	32
Resultados e Discussão.....	40
Referências.....	45
 CAPÍTULO 3. IDENTIFICAÇÃO DE POLIMORFISMOS NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE DA ENZIMA <i>Stearoyl-CoA Desaturase</i> E ASSOCIAÇÕES COM AS QUANTIDADES DE ÁCIDOS GRAXOS PRODUZIDOS NO LEITE DE BÚFALAS	
Resumo.....	50
Abstract.....	51
Introdução.....	52
Material e Métodos.....	55
Resultados e Discussão.....	65
CONCLUSÕES GERAIS.....	73
Referências.....	73
 APÊNDICE.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS

g.....	grama
Kg.....	10^3
μ g.....	10^{-6} g
ng.....	10^{-9} g
L.....	Litro
mL.....	10^{-3} L
μ L... ..	10^{-6} L
CLA.....	Ácido Linoléico Conjugado
TEB.....	Broto de ramificação terminal
SCD.....	Estearoil-Coenzima A Dessaturase
NADP.....	Fosfato de Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina
NADPH.....	Fosfato de Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina reduzido
DNA.....	ácido desoxiribonucleotídico
RNA.....	ácido ribonucleotídico
mRNA.....	ácido ribonúcleotídico mensageiro
b.....	Base Núcleotídica
pb.....	Par de Base Núcleotídica
Kb.....	10^3 pb
Éxons.....	Regiões Expressadas
Íntrons.....	Regiões Intra-gênicas
MMAS.....	Seleção Assistida por Marcadores Moleculares
SREBP-1.....	Proteína de ligação reguladora de Esterol-1
NF-Y.....	Fator de transcrição nuclear-Y
NF-1.....	Fator de transcrição nuclear-1
AP-1.....	Ativador de proteína-1
FSE.....	Elemento graxo-específico
HNF-4.....	Fator nuclear do hepatócito-4
GW.....	Caminhador do genoma
PCR.....	Reação em Cadeia da Polimerase
SSCP.....	Polimorfismos de Conformação de Cadeia Simples
Primer.....	iniciador de PCR
UV.....	Luz ultravioleta
pH.....	potencial Hidrogeniônico
SNP.....	Polimorfismos de nucleotídeo único

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Plano de construção das reações de PCR nas bibliotecas GW.....	36
Tabela 2. Resultados obtidos pela análise de similaridade de seqüências de nucleotídeos da região promotora do gene da SCD bubalina com as seqüências da espécie bovina disponíveis no GenBank.....	42
Tabela 3 Freqüências gênicas e genotípicas da região promotora da SCD obtidas com PCR-SSCP. Os valores entre parênteses correspondem ao número observado de animais para cada genótipo identificado.....	67
Tabela 4. Médias dos quadrados mínimos de ácidos graxos produzidos no leite de búfalas (g / 100g de gordura) nas diferentes classes de lactação.....	69
Tabela 5. Médias dos quadrados mínimos de ácidos graxos produzidos no leite de búfalas (g / 100g de gordura) em função dos genótipos da SCD obtidos.....	70
Tabela 6. Médias dos quadrados mínimos das taxas de desaturação de ácidos graxos produzidos no leite de búfalas (g / 100g de gordura) em função dos genótipos da SCD obtidos.....	71

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estrutura molecular dos isômeros do CLA.....	4
Figura 2. Mecanismos de síntese do CLA em ruminantes.....	7
Figura 3. Conjunto microssômico da SCD agindo sobre ácido graxo.....	10
Figura 4. Mecanismo de ação da SCD sobre o ácido vacênico para a formação do cis-9, trans-11CLA na glândula mamária.....	11
Figura 5. Seqüências nucleotídicas do adaptador GW e dos ““primer”s” PA1 e PA2.....	33
Figura 6. Esquema simplificado das etapas do desenvolvimento da técnica GW.....	34
Figura 7. Foto representativa das reações de digestão na montagem das bibliotecas GW.....	39
Figura 8. Foto representativa da reação de PCR primária das bibliotecas GW.....	40
Figura 9. Foto representativa da reação de PCR secundária das bibliotecas GW.....	41
Figura 10. Alinhamento da seqüência bubalina obtida na biblioteca DL3 com a	

seqüência da região promotora da SCD bovina (AJ555480.2).....43

Figura 11. Foto representativa dos produtos obtidos nas reações preliminares de PCR, com o respectivo gradiente de temperaturas.....64

Figura 12. Foto representativa dos fragmentos de 588 pb obtidos nas reações de PCR.....64

Figura 13. Foto e eletroferograma representativos dos 3 diferentes padrões de migração obtidos pela aplicação da técnica de DNA-SSCP na região promotora do gene da SCD bubalina.....65

Figura 14. Cromatogramas representativos dos polimorfismos identificados após reações de clonagem e seqüenciamento.....66

CAPÍTULO 1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1. *Panorama atual da bubalinocultura no Brasil*

De acordo com a FAO (2002), a população mundial de búfalos é estimada em 162 milhões de cabeças com 98% deste total constituído por animais do subgênero **bubalis**, também conhecidos como “Búfalos da Água” – ordem **Artiodactyla**, família **Bovidae**, subfamília **Bovinae**, gênero **Bubalus** – (SMITH, 1827). Dentre estes animais, as duas espécies mais representativas da população são: a **Bubalus bubalis bubalis**, ou “Búfalo do rio” ($2n = 50$ cromossomos) e a **Bubalus bubalis carabanesesis** ($2n = 48$ cromossomos), também conhecida como “Búfalo do pântano”. No Brasil, os primeiros lotes destes animais foram importados da Ásia (Índia), Europa (Itália) e América Central (Caribe) no final do século XIX, a princípio, mais por características exóticas (BERNARDES, 2007).

A partir da década de 60, ocorreu no país um crescente interesse na exploração zootécnica dos búfalos que resultou em taxas expressivas de crescimento anual do rebanho nacional, variando entre 38% a 45% até o ano de 2005. Atualmente o Brasil possui o maior rebanho bubalino do ocidente, com uma população estimada em torno de 3,5 milhões de cabeças. A maior concentração do rebanho brasileiro está na região Norte (50% do total), seguida das regiões Sudeste, Nordeste, Centro-Oeste e Sul, com 15%, 14%, 12% e 9%, respectivamente (ANDRIGHETTO *et al.*, 2005; ABCB, 2008).

Deve-se considerar também, a existência de algumas peculiaridades inerentes a esta espécie animal que contribuíram significativamente para o desenvolvimento da bubalinocultura brasileira, como por exemplo: fertilidade e longevidade produtiva da espécie; eficiência em conversão de alimentos volumosos com baixa disponibilidade de nutrientes; boa capacidade de aclimação a ambientes alagadiços e/ou pantanosos, bem como provimento de energia sob forma da tração animal aplicada ao solo nestes

ambientes; capacidade de melhorar a fertilidade do solo em função da deposição de seus dejetos (fezes e urina), aumentando as taxas de material orgânico e matéria orgânica do solo; leite e carne de elevados valores nutricionais e organoléptico/sensoriais - odor, sabor, aparência e textura - (FAO, 2002; GUERRA *et al.*, 2005; BERNARDES, 2007).

A Associação Brasileira de Criadores de Búfalos (ABCB) considera as raças Murrah, Mediterrâneo, Jafarabadi - *B. bubalis bubalis* - e Carabao – *B. bubalis carabanesis* - como predominantes na composição do rebanho nacional, com animais criados predominantemente sob os sistemas extensivo e semi-extensivo. Os animais destinados à exploração da pecuária de corte mostram um potencial de ganho de peso bem semelhante a zebuínos, quando terminados em confinamentos ou mesmo quando criados integralmente em condições extensivas, sob regime de pastejo em áreas nativas ou cultivadas (ZICARELLI, 1994; VALLE, 1999; MARQUES *et al.*, 2006).

Somado ao potencial produtivo dos animais, a qualidade da carne bubalina deve ser considerada, pois se assemelha muito à carne bovina em termos sensoriais com a vantagem de possuir maior teor de proteína e menores valores totais de calorias, gorduras saturadas e colesterol (TONHATI & LIMA, 2003; MADELLA-OLIVEIRA *et al.*, 2005).

No final da década de 80, a implantação de unidades industriais voltadas ao beneficiamento e produção de derivados lácteos bubalinos, gerou uma grande expansão na criação destes animais voltada exclusivamente para a exploração da pecuária leiteira. Somado a isto, os sistemas extensivo e semi-intensivo propiciam custos reduzidos para a produção de leite que tornam o lucro aos produtores bastante satisfatório, pois o preço pago por alguns laticínios pelo litro de leite pode chegar, em períodos de entressafra, a até R\$ 1,00.

A porcentagem média de proteína observada no leite bubalino encontra-se entre 3,60 e 4,55% (TONHATI, 1998; MACEDO, 2001; ROSATI & VAN VLECK, 2002) e os teores médios de gordura estão entre 6,87% a 8,59% (TONHATI, 2000; ROSATI & VAN VLECK, 2002). Por possuir teores elevados de proteína e gordura, o leite bubalino proporciona bom rendimento na obtenção de derivados, mostrando-se também um

produto altamente lucrativo para os laticínios. De acordo com MADALENA (1986), a gordura e a proteína do leite são os constituintes que possuem maior valor econômico, sendo estes também responsáveis pelas características organolépticas (estrutura, cor, sabor e textura) dos derivados (BRITO & DIAS, 1998).

Segundo estimativas do ANUALPEC (2009), a produção de leite de búfalas no Brasil é de 92,3 milhões de litros, produzidos por cerca de 82.000 animais em 2.500 rebanhos. Atualmente existem, pelo menos, 150 indústrias produzindo derivados do leite de búfalas no país que transformam anualmente 45 milhões de litros de leite em 18,5 mil toneladas de derivados, gerando um faturamento bruto da ordem de U\$ 55 milhões aos laticínios e de cerca de U\$ 17 milhões aos criadores.

Dentre os derivados obtidos com o leite de búfala, o queijo “Mozzarella” é, indubitavelmente, o produto mais comercializado e que apresenta maior produção nos laticínios. Por possuir baixos teores de colesterol, elevada concentração de vitamina A e algumas características peculiares como coloração e textura, a “Mozzarella” tornou-se um produto altamente consumido pelas classes A e B, principalmente na região Sudeste aonde o kg deste queijo chega a ser vendido, em média, a R\$ 25,00.

1.2. Considerações sobre o Ácido Linoléico Conjugado (CLA)

A exposição de algumas carnes a altas temperaturas por determinados períodos de tempo durante o processo de cocção, ocasiona a liberação de substâncias químicas carcinogênicas que não estão presentes nas mesmas quando cruas. Estas substâncias foram identificadas e são denominadas Aminas Heterocíclicas ou HCAs (PARIZA **et al.**, 1979; NADER **et al.**, 1981; ADAMSON & THORGEIRSSON 1990).

Ao avaliarem o extrato de carne bovina antes e após a cocção, PARIZA **et al.** (1983), verificaram a existência de um componente anticarcinogênico que não só inibia o efeito das HCAs, mas também estava presente na carne crua ou cozida, indicando que o cozimento não degradava este componente. HA **et al.** (1987) verificaram que este componente anticarcinogênico estava presente na fração lipídica da carne.

Estes autores submeteram a gordura extraída da carne a processos de cromatografia líquida de alta pressão, cromatografia gasosa em espectrofotômetro de massa e espectroscopia de ressonância magnética nuclear, verificando a existência de isômeros derivados do ácido linoléico, que possuíam suas respectivas duplas ligações dispostas de forma conjugada, ou seja, intercaladas por uma ligação simples. Estes ácidos graxos foram então, denominados Ácidos Linoléicos Conjugados (CLA).

O termo CLA representa vários isômeros geométricos e posicionais de um ácido graxo octadecadienóico - 18 Carbonos – onde os isômeros **trans**-10, **cis**-12CLA e **cis**-9, **trans**-11CLA são os mais estudados, por apresentarem maior atividade biológica (BAUMAN *et al.*, 2000). A Figura 1 ilustra a estrutura molecular destes dois isômeros.

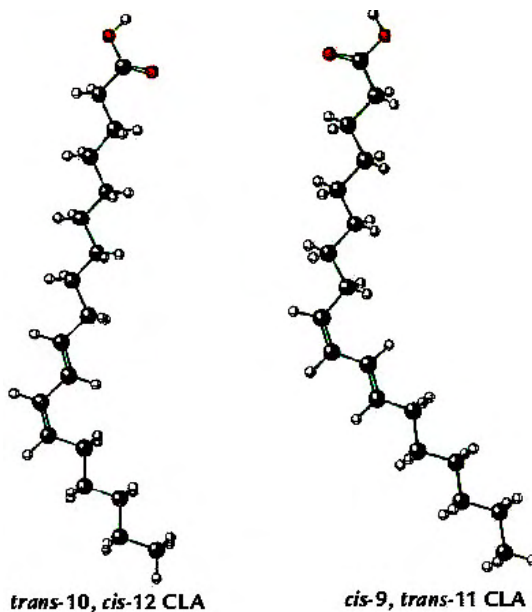


Figura 2. Estrutura molecular dos isômeros do CLA. - adaptado de BAUMAN *et al.*, (2000).

O efeito do isômero **trans**-10, **cis**-12CLA é atribuído principalmente à redução da gordura corporal. Em um estudo realizado por WEST *et al.* (2000), a dieta de camundongos foi suplementada com o t10c12CLA, resultando em redução no tecido adiposo dos animais variando de 43% a 88%. Estes valores corroboram com aqueles

obtidos por PARK **et al.** (1997), mostrando que a suplementação de camundongos com este isômero, não só reduziu 60% da gordura corporal, mas também aumentou em até 14% a proporção de massa magra nos animais.

Em seres humanos obesos, alguns autores também demonstraram que a suplementação do **trans**-10, **cis**-12CLA na dieta proporciona redução significativa nos teores de gordura corporal (BLANKSON **et al.**, 2000; RISERUS, 2001), sugerindo uma ingestão diária mínima de 3,4g de CLA. PARK **et al.** (1999) inferiram que o CLA pode ter seu efeito relacionado com o aumento nas taxas de lipólise, o que contribui diretamente para a redução do tecido adiposo na composição corporal. O **trans**-10, **cis**-12CLA também possui efeito positivo associado à doenças tidas como metabólicas ocasionadas pela obesidade, como diabetes tipo I e II, doenças coronárias e hipertensão (AGNIESKA & NTAMBI, 2005), além da modulação do sistema imunológico e prevenção de algumas doenças neurológicas (MIYAZAKI & NTAMBI, 2003).

O **cis**-9, **trans**-11CLA é o isômero com maior ação anticarcinogênica (O'SHEA **et al.**, 2000; CORL **et al.**, 2001). Sua função primária é a manutenção da integridade das membranas lipoprotéicas das células, o que impede ou dificulta a passagem de redes microcapilares (angiogênese) e outros componentes oriundos de células cancerosas que funcionam como sinais para a diferenciação de células vizinhas.

Avaliando a ação do CLA em tumores da glândula mamária, IP (2001) inferiu que o **cis**-9, **trans**-11CLA estocado nos adipócitos tem a função de suprir células adjacentes durante o crescimento e renovação celular do epitélio mamário, garantindo assim a integridade estrutural das membranas celulares recém-formadas.

IP **et al.** (2001) relataram uma ação indireta do CLA na redução da capacidade angiogênica de células do estroma mamário. Estes autores suplementaram a dieta de ratas com o **cis**-9, **trans**-11CLA e as submeteram à ingestão de 10 mg de dimetilbenzeno-antraceno, um potente indutor da carcinogênese. Os resultados mostraram o efeito positivo do CLA na inibição do aparecimento de tumores mamários em 32% e 60%, para ratas que ingeriram 0,5% e 1,5%, respectivamente, do isômero na dieta.

Também estudando ratas, BANNI *et al.* (1999) mostraram a influência do CLA na diminuição de tumores mamários pela ação direta em estruturas primárias denominadas “terminal end buds” (TEBs), que funcionam como sítios de ligação para substâncias carcinogênicas. Os animais avaliados obtiveram redução substancial na densidade de TEBs no tecido mamário proporcional ao aumento das dosagens de CLA dietético (0,5% a 1,0%), reduzindo substancialmente o aparecimento de tumores mesmo na presença de estimulantes da carcinogênese.

Outra função do **cis-9, trans-11CLA** é desencadear a apoptose das células cancerosas e, conseqüentemente, reduzir o tamanho de tumores. Entretanto, o mecanismo exato desta sinalização, para agir especificamente nas células doentes, ainda não está bem elucidado. Vários estudos demonstraram os efeitos positivos deste isômero 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), indicando a diminuição de metástases e do tamanho dos tumores. Alguns órgãos internacionais como a “National Academy of Sciences” e o “National Cancer Institute” consideram que, indubitavelmente, o **cis-9, trans-11CLA** é a substância de origem animal com a maior capacidade auxiliar na prevenção e no tratamento de câncer.

1.2.1. A síntese do CLA em ruminantes

As maiores fontes naturais dos isômeros **trans-10, cis-12CLA** e **cis-9, trans-11CLA**, disponíveis para o consumo humano, são produtos oriundos de ruminantes, principalmente o leite e seus derivados (PARODI *et al.*, 1997; GRIINARI & BAUMAN, 1999). TANDON *et al.* (2006), avaliaram as quantidades de **cis-9, trans-11CLA** presentes em leite bovino cru, leite bovino homogeneizado, creme de leite, manteiga, queijo, iogurte e sorvete, relatando valores médios (mg de CLA / g de gordura) iguais a 5,5;4,5; 7,0; 6,1; 4,9; 4,8 e 3,6, respectivamente.

De acordo com KEENEY (1970), os lipídeos dietéticos ingeridos por ruminantes, passam por duas transformações importantes. A primeira delas é a hidrólise das ligações éster, realizada por lipases bacterianas. Após a hidrólise, os ácidos graxos insaturados são liberados no fluido ruminal e seguem para a segunda transformação denominada biohidrogenação. Este processo, realizado por bactérias ruminais anaeróbias - principalmente a *Butyrivibrio fibrisolvens* -, consiste em reduzir o número de ligações duplas das cadeias carbônicas dos ácidos graxos (saturação) e acrescentar átomos de Hidrogênio às mesmas.

Conforme ilustrado na Figura 2, nos ruminantes existem duas vias para a síntese de CLA a partir do ácido linoléico dietético, uma exógena e a outra endógena.

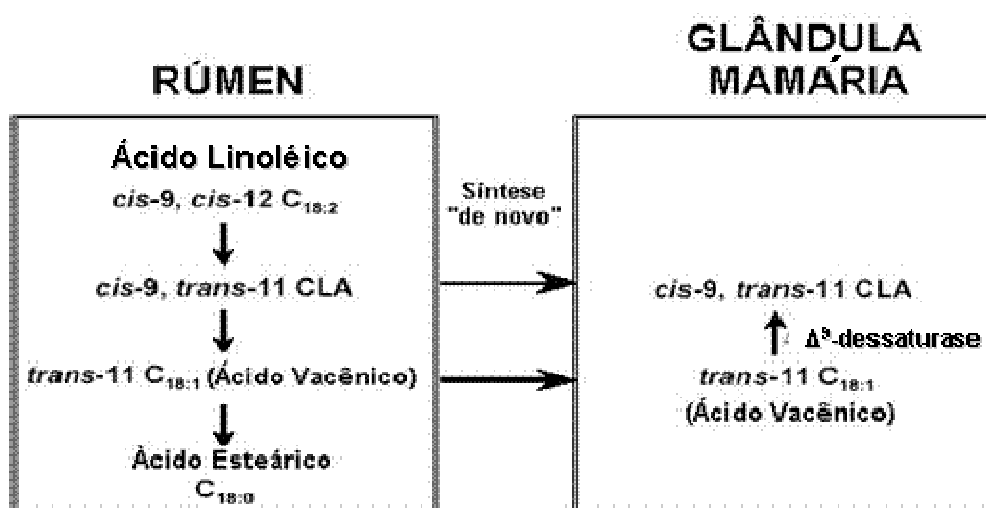


Figura 3. : Mecanismos de síntese do CLA em ruminantes. (adaptado de BAUMAN *et al.*, 2000).

A via exógena ocorre no rúmen (abomaso), onde o ácido linoléico (*cis-9, cis-12 C_{18:2}*) proveniente da dieta, é transformado em ácido estearico (*C_{18:0}*). Este processo envolve duas etapas intermediárias: inicialmente, ocorre a isomerização da dupla ligação *cis-12* resultando na formação do *cis-9, trans-11CLA*; a etapa seguinte é a saturação cadeia carbônica, alterando para "simples" a dupla ligação da posição *cis-9* que resulta em ácido vacênico (*trans-11 C_{18:1}*); a fase final deste processo, é a

saturação da última dupla ligação remanescente na posição **trans**-11, que resulta em um ácido graxo totalmente saturado, o ácido esteárico.

As duas primeiras etapas do processo supracitado são relativamente rápidas, enquanto a última fase é lenta. Como consequência, ocorre o acúmulo de grandes quantidades do ácido vacênico no rúmen, ficando este então disponível para reabsorção via síntese “de novo” (KEENEY, 1970; VAN SOEST, 1994; HARFOOT & HAZLEWOOD, 1988).

A via endógena da síntese do CLA, segundo GRIINARI **et al.** (2000), ocorre na glândula mamária pela ação de uma enzima Δ^9 dessaturase, a qual transforma o ácido vacênico em **cis**-9, **trans**-11CLA. Alguns autores observaram que existe relação linear positiva entre o conteúdo de ácido vacênico e o **cis**-9,**trans**-11CLA na gordura do leite de ruminantes (GRIINARI e BAUMAN, 1999; BEHROUZIAN **et al.**, 2002).

Somado a isto, a biohidrogenação de outros ácidos graxos poliinsaturados, além do ácido linoléico, também contribui para um aumento significativo na quantidade de ácido vacênico que chega até a glândula mamária via síntese “de novo”. Alguns autores relataram valores entre 60 g a 300 g / dia de ácido vacênico chegando ao duodeno de vacas leiteiras (WONSIL **et al.**, 1994; KALSCHEUR **et al.**, 1997; GRIINARI e BAUMAN, 1999).

Esta biossíntese que ocorre na glândula mamária representa a fonte mais importante de **cis**-9,**trans**-11CLA encontrado na gordura do leite (GRIINARI **et al.**, 2000; BENJAMIN **et al.**, 2001). Trabalhando com animais em sistema de pastejo, KAY **et al.** (2002), observaram que 87% do **cis**-9, **trans**-11CLA total presente na gordura do leite era sintetizado endogenamente. De acordo com BERNARD **et al.** (2001) e GRIINARI **et al.** (2000), a enzima Δ^9 dessaturase responsável pela biossíntese do CLA é denominada **Estearoil-Coenzima A dessaturase** (SCD).

1.2.2. Fatores que alteram a quantidade de CLA no leite produzido

Considerando que o CLA é um ácido graxo, suas concentrações na gordura do leite produzido estão sujeitas a um amplo grau de variação. Basicamente, o conteúdo de **cis-9**, **trans-11**CLA contido nesta gordura sempre dependerá de 2 fatores principais: a produção ruminal de ácido vacênico e a atividade da SCD na glândula mamária. Em virtude destes fatos, qualquer intenção em aumentar a produção de CLA deverá ser direcionada, direta ou indiretamente a estes fatores.

As diferentes produções de CLA, quando comparadas entre rebanhos sugerem grande influência da dieta a que os animais são submetidos, pois esta irá atuar na produção de ácido vacênico ruminal (BAUMAN, 1999). GRIINARI & BAUMAN (1999), relataram que a produção deste ácido graxo pode ser aumentada pelo acréscimo de óleos vegetais ricos em ácido linoléico e linolênico na dieta dos animais, disponibilizando assim, maiores quantidades de substratos para a biohidrogenação ruminal.

Estes autores indicaram também que dietas ricas em alimentos volumosos proporcionam alterações favoráveis na composição da microbiota ruminal, o que aumenta a biossíntese de ácido vacênico. BAUMAN **et al.** (2001), mostraram que vacas lactantes mantidas sob regime de pastejo chegam a produzir o triplo de CLA no leite, em comparação a vacas em confinamento alimentadas com rações concentradas a base de milho. Os autores inferiram ainda, que os aumentos nos teores de **cis-9**, **trans-11**CLA secretados na gordura do leite são diretamente proporcionais à quantidade de volumoso da dieta das vacas.

Vacas alimentadas com a mesma dieta demonstraram variações individuais altamente significativas (oscilando entre 3 e 10 vezes) para o teor de CLA na gordura do leite produzido (JIANG **et al.**, 1996; SOLOMON **et al.**, 2000; WHITE **et al.**, 2001; PETERSON **et al.**, 2002). Cabe ressaltar que FERNANDES (2004) também encontrou diferenças individuais significativas para esta característica na espécie bubalina.

Segundo CHILLIARD **et al.** (2000) e GRIINARI **et al.** (2000), as razões para esta variação podem ser atribuídas a diferenças nos níveis de expressão e atividade da SCD nos tecidos da glândula mamária de ruminantes. Corroborando estes autores, PETERSON **et al.** (2002) citam outras possibilidades para explicar esta variação, como

alterações na região promotora que regula a expressão gênica da SCD, ou ainda, diferenças na estrutura da enzima ocasionadas por polimorfismos do gene que a expressa.

1.3. A Estearoil-Coenzima A dessaturase (SCD)

A SCD é uma enzima comum em células de organismos procariontes e eucariontes. Segundo ENOCH *et al.* (1976), esta enzima assume papel chave na biossíntese celular de ácidos graxos monoinsaturados, pois é responsável pela introdução da primeira ligação dupla de alinhamento **cis**, na posição 9 da cadeia carbônica, onde catalisa radicais carboxila (daí a designação “Δ”) de uma ampla variedade de substratos acil-CoA de gorduras saturadas. Seu local de atuação é na membrana do retículo endoplasmático liso, atuando como limitante da atividade de um conjunto microssômico composto sequencialmente de NADH (P), citocromo b_5 redutase, citocromo b_5 e oxigênio (NTAMBI *et al.*, 1999). A Figura 3 mostra o mecanismo de ação deste conjunto para a inserção de uma ligação dupla entre carbonos.

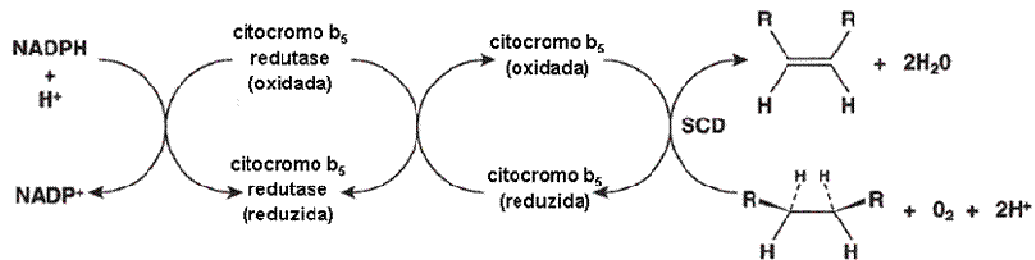


Figura 4. Conjunto microssômico da SCD agindo sobre ácido graxo.(Adaptado de NTAMBI 1999).

Na glândula mamária de ruminantes, a SCD realiza esta desaturação oxidativa no ácido vacênico circulante, formando o **cis**-9, **trans**-11CLA. Ela remove 2 átomos de

hidrogênio, o primeiro na carboxila 9 e o segundo na carboxila 10 da cadeia carbônica (Figura 4). Este mecanismo, é específico para a posição onde será introduzida a dupla ligação entre carbonos (SUN *et al.*, 2003).

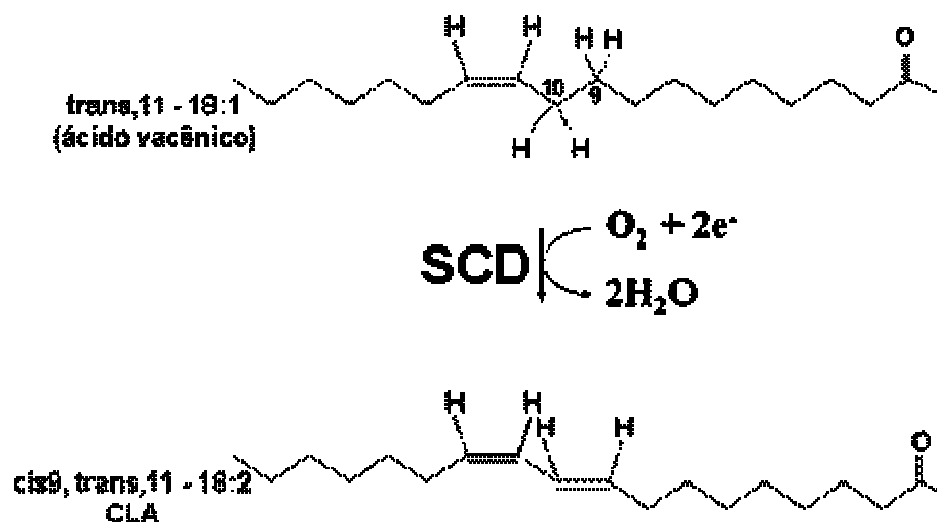


Figura 4. Mecanismo de ação da SCD sobre o ácido vacênico para a formação do *cis*-9, *trans*-11CLA na glândula mamária.

As reações que envolvem dessaturases são essenciais para manter as características de fluidez das membranas lipoprotéicas das células. Este efeito, na glândula mamária, relaciona-se diretamente com a fluidez da gordura do leite, indispensável para manter sua secreção normal (PERFIELD *et al.*, 2002; NAKAMURA e NARA, 2004).

Em estudo para avaliar a atividade da SCD, GRIINARI *et al.* (2000), delinearam dois experimentos com vacas em lactação. No primeiro, foi realizada a infusão abomasal de ácido vacênico, no segundo, infundiram óleo da Estercúlia (*Sterculia foetida*), que contém o ácido estercúlico, conhecido por inibir a atividade da SCD. Houve aumento de 31% na produção de *cis*-9, *trans*-11CLA no leite dos animais do primeiro experimento e redução de 45% no total deste isômero no leite dos animais do

segundo experimento, confirmando a hipótese de que a atividade da SCD exerce grande influência na via endógena da síntese deste isômero do CLA.

A atividade da SCD na glândula mamária também pode ser avaliada indiretamente, a partir das quantidades totais de gordura monoinsaturada do leite e das taxas de conversão (desaturação) dos ácidos graxos 14:0 em 14:1 cis-9, 16:0 em 16:1 cis-9 e 18:0 em 18:1 cis-9 (NTAMBI, 1995; BAUMAN *et al.*, 1999). Corroborando estes autores SOYEURT *et al.* (2008) relataram a existência de correlações genéticas positivas entre os teores de gordura monoinsaturada e as taxas de saturação dos ácidos com 14, 16 e 18 carbonos, com valores de 0,72; 0,62 e 0,97, respectivamente.

1.3.1. Estrutura do gene da enzima SCD

Pouco se sabe a respeito da regulação da expressão do gene da SCD e sua atividade em tecidos de ruminantes, particularmente, na glândula mamária (BERNARD *et al.*, 2001). Em roedores, a ação da SCD é controlada pela transcrição de dois genes relacionados, o SCD1 e o SCD2, onde o mRNA do SCD1 é expressado no tecido adiposo e o mRNA do SCD2 é expressado no cérebro (KAESTNER *et al.* 1989; NTAMBI *et al.* 1998). Em estudos com humanos também foram detectados dois mRNAs da SCD gerados a partir de sítios de poliadenilação alternativos (ZHANG *et al.* 1999).

A estrutura dos genes da SCD de roedores e humanos (número de acesso no GenBank : AB003357 e Y13647, respectivamente) é bem similar, com aproximadamente 15 Kb que englobam 6 éxons e 5 íntrons (NTAMBI *et al.* 1998 e ZHANG *et al.* 1999). A localização do gene da SCD em humanos é no cromossomo 10, com um pseudogene no cromossomo 17 (ZHANG *et al.* 1999). Nos roedores o gene foi localizado no cromossomo 19, por TABOR *et al.* (1998). REN *et al.* (2003), mapearam o gene da SCD em suínos no cromossomo 14q27 (número de acesso no GenBank: Z67186) utilizando técnicas de hibridização por fluorescência *in situ*. Em ruminantes, BERNARD *et al.*, (2001) caracterizaram o gene da SCD (número de acesso no GenBank: AF325499) com 15 Kb, 6 éxons e 5 íntrons, localizados no cromossomo

26q21 de caprinos leiteiros. Estes resultados foram semelhantes àqueles obtidos por CAMPBELL *et al.* (2001), que caracterizaram o gene da SCD na espécie bovina (número de acesso no GenBank: AF188710);

Com relação à região promotora, responsável por determinar a intensidade da expressão do gene da SCD, observa-se que a composição nucleotídica foi descrita para humanos (GenBank nº: Y13647, ZHANG *et al.*, 2004), ratos (GenBank nº: AB003357, ZHENG *et al.*, 2001; MIYAZAKI *et al.*, 2003), suínos (GenBank nº: Z67186, REN *et al.*, 2003) e também algumas espécies ruminantes como ovinos (GenBank nº: AJ001048, WARD *et al.*, 1998), caprinos (GenBank nº: AF325499, BERNARD *et al.*, 2001), e bovinos (GenBank nº: AJ555480.2, KEATING *et al.*, 2006).

Comparando sequências nucleotídicas apenas da região promotora da SCD bovina, com a região promotora deste gene em humanos e ratos, KEATING *et al.*, (2006) encontraram homologia de 67% e 59%, respectivamente. Se considerarmos comparações de similaridade apenas entre ruminantes, esta homologia atinge valores que variam de 95% a 98% entre ovinos, bovinos e caprinos (BERNARD *et al.*, 2001; YAHYAOUI *et al.*, 2002). Este fato, torna perfeitamente viável a utilização de informações já descritas em outras espécies para realização de estudos genéticos da SCD em bubalinos.

Somado a isto, o uso de técnicas moleculares para a detecção de polimorfismos na região promotora do gene da SCD, nos permite verificar suas variações e possíveis influências na via endógena da síntese do CLA em bubalinos, possibilitando assim, a seleção de reprodutores assistida por marcadores moleculares (MMAS).

1.4. Marcadores Moleculares no melhoramento genético animal

Técnicas moleculares aliadas a procedimentos tradicionais de melhoramento genético, poderão proporcionar maior ganho genético ao se determinar o potencial do animal, antes que este expresse o seu fenótipo (REGITANO *et al.*, 2001). O marcador genético serve para relacionar favoravelmente alelos de características quantitativas, no

caso a síntese endógena de CLA, e informações sobre o modo de ação gênica individual e suas interações, auxiliando na compreensão da variação destas características e sua utilização prática na criação animal (MARANHÃO, 2000).

Segundo HALEY (1995), os marcadores de DNA apresentam duas possíveis aplicações futuras na seleção animal: as combinações dos melhores alelos de duas ou mais raças e a seleção dos melhores alelos dentro de uma raça ou linhagem.

O uso de seleção assistida por marcadores moleculares baseia-se no princípio de que, se um gene (ou conjunto de genes) é localizado por um marcador de fácil identificação associado a **loci** de características quantitativas, a seleção para este marcador será mais eficiente do que para o próprio fenótipo (HAYWARD *et al.*, 1994).

Esta ferramenta pode auxiliar o progresso genético dentro de um programa de melhoramento em vários aspectos:

- Aumentando a acurácia;
- Reduzindo o intervalo de gerações;
- Melhorando a eficiência das avaliações genéticas;
- Permitindo melhor aproveitamento da complementaridade entre indivíduos;

Com base nestas considerações gerais, o presente estudo foi conduzido sob o intuito de obter informações inerentes à região promotora do gene da SCD na espécie ***Bubalus bubalis***, verificando a existência de polimorfismos nesta região e suas possíveis associações com os níveis de ácidos graxos monoinsaturados e poliinsaturados (CLA) produzidos no leite.

OBJETIVOS GERAIS

O presente estudo foi conduzido para atender aos seguintes objetivos gerais:

- Caracterizar a região promotora do gene da SCD na espécie ***Bubalus bubalis***;
- Aplicar a técnica de análise molecular DNA-SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) para identificar possíveis polimorfismos genéticos nesta região;
- Verificar a possibilidade de associação de polimorfismos genéticos com as quantidades do isômero ***cis***-9, ***trans***-11CLA e de outros ácidos graxos monoinsaturados produzidos na gordura do leite de búfalas;

REFERÊNCIAS*

ADAMSON, R.H.; THORGEIRSSON, U.P.; SNYDERWINE, E.G. **et al.** Carcinogenicity of 2-amino-3-methylimidazol [4,5-f] quinoline in nonhuman primates: Induction of tumors in three macaques. **Japanese Journal of Cancer Research** 81(1):10-14,1990.

AGNIESKA, D; NTAMBI, J. The role of stearyl-CoA desaturase in the control of metabolism. **Prostaglandins, Leucotrienes and Essential Fatty Acids** v. 73, p. 35-41, 2005.

ANDRIGHETTO, C., **et al.** Efeito da monensina sódica sobre a produção e composição do leite, a produção de mozzarella e o escore de condição corporal de búfalas Murrah. **R. Bras. Zootec.** vol.34 no.2 Viçosa Mar./Apr. 2005

ANUALPEC. **Anuário da Pecuária Brasileira**. AgraFNP Consultoria & Comércio. São Paulo: Argos, 392p, 2009.

BANNI, S.; ANGIONI, E.; CASU, V.; MELIS, M.P.; CARTA, G.; CORONGIU, F.P.; THOMPSON, H.; IP, C. Decrease in linoleic acid metabolites as a potential mechanism in cancer risk reduction by conjugated linoleic acid. **Carcinogenesis**, v.20, p.1019-1024, 1999.

BAUMAN, D. E., L. H. BAUMGARD, B. A. CORL, GRIINARI J. M.. Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants.In: **Proc. Am. Soc. Anim. Sci.** 1999. Disponível em <http://www.asas.org/jas/symposia/proceedings/0937.pdf>.

BAUMAN, D.E., The role of $\Delta 9$ -desaturase in the production of cis-9, trans-11 CLA. **Journal of Nutritional Biochemistry** v.12 , p.622–630, 2001

* ABNT, 2002

BEHROUZIAN, B., SAVILE, C.K., DAWSON, B., BUIST, P.H., SHANKLIN J., Exploring the hydroxylation–dehydrogenation connection: novel catalytic activity of castor stearyl-ACP $\Delta 9$ -desaturase, **J. Am. Chem. Soc.** v.124, p.3277–3283, 2002.

BENJAMIN A. C., BAUNGARD, L. H., DWYER, D. A., GRIINARI, J. M., PHILLIPS, B. S., BAUMAN, D.E., The role of $\Delta 9$ -desaturase in the production of cis-9, trans-11 CLA., **Journal of Nutritional Biochemistry** v.12, p.622–630, 2001

BERNARD, L., LEROUX, C., HAYES, H., GAUTIER, M., CHILLIARD, Y., MARTIN, P. Characterization of the caprine stearyl-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.

BERNARDES, O. Bubalinocultura no Brasil: situação e importância econômica. **Rev. Bras. Reprod. Anim.** v.31, n.3, p.293-298, jul./set. 2007

BLANKSON, H.; STAKKESTAD, J. A; FAGERTUN, H.; THOM, E.; WADSTEIN, J.; GUDMUNDSEN, O. Conjugated linoleic acid reduces body fat mass in overweight obese humans. **Journal of Nutrition** v.130, n.12, p.2943-2948, dez. 2000.

BRITO, J.R.F.; DIAS, J.C. **A qualidade do leite**. Juiz de Fora: EMBRAPA, 88p, 1998.

CAMPBELL, E. M. G., GALLAGHER, S. K., DAVIS, D. S., TAYLOR, J. F., SMITH, S. B., Rapid communication: Mapping of the bovine stearyl-coenzyme A desaturase (SCD) gene to BTA261. **American Society of Animal Science**, p. 1954-1955, 2001.

CHILLIARD, Y., FERLAY, A., MANSBRIDGE, R.M., DOREAU, M., Ruminant milk fat plasticity: nutritional control of saturated, polyunsaturated, trans and conjugated fatty acids. **Ann. Zootech.** v.49, p.181–205, 2000.

CORL, B. A.; BAUNGARD, H.; DWYER, D. A., *et al.* The role of Δ^9 desaturase in the production of cis-9 trans-11 CLA. **J. Nutr. Biochem.** V.12, p.622-630 ,2001.

ENOCH, H.G., CATALA, A., STRITTMATTER, P., Mechanism of rat liver microsomal Stearoyl-CoA desaturase. Studies of the substrate specificity, enzyme-substrate interactions, and the function of lipid, **J. Biol. Chem.** v.251, p.5095–5103, 1976.

F.A.O. Water Buffalo: an Asset Undervalue., In: **Bulletin of Food and Agriculture Organization**-Regional Office for Asian and Pacific, Bangkok, Thailand; p.12-17, 2000.

FERNANDES, S.A.A. – Levantamento exploratório da produção, composição e perfil de ácidos graxos no leite de búfalas em cinco fazendas do estado de São Paulo. 138f. **Tese (doutorado)** ESALQ, USP-Piracicaba. 2004

GRIINARI, J. M., CORL, B. A., LACY, S. H. , CHOUINARD, P. Y., NURMELA, K. V. V., BAUMAN, D. E... Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating cows by Δ^9 -desaturase. **J. Nutr.** v.130, p.2285-2291, 2000

GRIINARI, J.M. e BAUMAN, D.E. Biosynthesis of conjugated linoleic acid and its incorporation into meat and milk in ruminants. In: **Advances in Conjugated Linoleic Acid Research**, edited by M.P. Yurawecz, M.M. Mossoba, J.K.G. Kramer, M.W. Pariza, and G.J. Nelson. Champaign, IL: American Oil Chemists Society Press, v.1, p.180-200, 1999.

GUERRA, R.B.; NEVES, E.C.A; PENA R.S. Caracterização e processamento de leite bubalino em pó em secador por nebulização. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** v.25, n.3, p. 443-447, jul./set. 2005

HA, Y.L.; GRIMM, N.K.; PARIZA, M.W. Anticarcinogens from fried ground beef: heat-altered derivatives of linoleic acid. **Carcinogenesis**, v.8, p.1881-1887, 1987.

HALEY, C.S. – Livestock QTLs – Bringing home the bacon? **Trends Genetics**, v.11, p.488-492, 1995.

HARFOOT, C.G.; HAZLEWOOD, G.P. Lipid metabolism in the rumen. In: HOBSON, P.N. (Ed.). **The rumen microbial ecosystem**, New York: Elsevier, 527p. 1988.

HAYWARD, M.D.; McADAM, N.J.; JONES, J.G.; EVANS, C.; EVANS, G.M.; FORSTER, J.W.; USTIN, A.; HOSSAIN, K.G.; QUADER, B.; STAMMERS, M.; WILL, J.K. Genetic markers and the selection of quantitative traits in forage grasses. **Euphytica**, v.77, p.269-75, 1994.

IP, M.M.; MASSO- WELCH, P.A.; IP, C.; ZANGANI, D.; LEE, P. Inhibition of angiogenesis by CLA. In: **International Conference on CLA**, 1., Norway, 2001. Proceedings. Alesund: NATURAL ASA, p.9, 2001.

JIANG, J., L. BJOERCK, R. FONDÉN; EMANUELSON, M. Occurrence of conjugated cis-9, trans-11- octadecadienoic acid in bovine milk: effects of feed and dietary regimen. **J. Dairy Sci.** v.79, p.438-445, 1996.

KAESTNER, K.H., NTAMBI, J.M., KELLY, T.J., LANE, M.D. Differentiation induced gene expression in 3T3-L1 preadipocytes: a second differentially expressed gene encoding stearoyl-CoA desaturase. **J. Biol. Chem.** v.264, p.14755–14761, 1989.

KALSCHEUR K. F., TETER P. B., PIPEROVA L. S. **et al.**, - Effect of fat source on duodenal flow of trans-C18:1 fatty acids and milk fat production in dairy cows. **J. Dairy Sci.** v.80, p.2215-2126, 1997.

KAY, J. K., MACKLE, T. R., AULDIST, M. J., THOMSON, N. A., BAUMAN, D. E.. 2002. Endogenous synthesis of cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid in pasture-fed dairy cows. **J. Dairy Sci.** v.85, n. 1, p.176, 2002.

KEATING A.F., KENNELLY J.J., ZHAO F.Q. Characterization and regulation of the bovine stearoyl-CoA desaturase gene promoter. **Biochem Biophys Res Commun.** v.344, n.1, p.233-40, 2006.

KEENEY, M. Lipid metabolism in the rumen. Pages 489-503 in: **Physiology of Digestion and Metabolism in the Ruminant**, A.T. Phillipson, ed. Oriel Press, Newcastle upon Tyne, UK, p.489-503, 1970

MACEDO, M.P. **et al.**, Composição físico-química e produção do leite de búfalas da raça Mediterrâneo no oeste do Estado de São Paulo. **Revista Brasileira Zootecnia** v. 30, suppl.1, p. , 2001.

MADALENA, F.E. Economic evaluation for milk and beef production in tropical environments. In: **World Congress Applied to Livestock Production**, v.9, p.33-43, 1986.

MADELLA-OLIVEIRA, A.F.; QUIRINO, C.R.;ADONA, P.R.; PACHECO, A. Aspectos da comercialização de carne e leite de bubalinos na região Norte Fluminense. **Rev. Bras. Reprod. Anim.** v.29, n.1, p.53-54, jan./mar. 2005.

MARANHÃO, A.M. – Níveis plasmáticos de IGF-I e polimorfismo no gene do GH como possíveis indicadores do potencial produtivo em bovinos. 2000. 38f. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Produção Animal), **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista**, Botucatu, 2000.

MARQUES, J.A.; IWAYAMA, P.T.; PRADO, I.N.; ALBUQUERQUE, K.P.; SCOMPARIN, V.X.; NASCIMENTO, W.G. Desempenho de novilhas búfalas terminadas em confinamento em resposta ao uso de promotor de crescimento ou de esferas de chumbo no útero. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v.58, n.6, p.1132-1138, 2006.

MILLER A., STANTON C., **et al.**, - Modulation of arachidonic acid distribution by conjugated linoleic acid isomers and linoleic acid in MCF-7 and SW480 cancer cells. **Lipids** v.36, p.1161-1168, 2001.

MIYAZAKI M., JACOBSON M. J., MAN W.C., **et al.**, -Identification and characterization of murine SCD-4, a novel heart-specific stearyl-CoA desaturase isoform regulated by leptin and dietary factors. **J. Biol. Chem.** v.278, p.33904-33911, 2003.

MIYAZAKI, M.;NTAMBI, J. N. Role of stearyl-coenzyme A desaturase in lipid metabolism. **Prostaglandins, Leucotrienes and Essential Fatty Acids** v.68, p. 113-121, 2003.

NADER, C.J.; SPENCER, L.K.; WELLER, R.A. Mutagen production during pan-broiling compared with microwave irradiation of beef. **Cancer Letter** v.13, n.2, p.147-152, 1981.

NAKAMURA M. T., NARA T. Y., Structure, function and dietary regulation of $\Delta 6$, $\Delta 5$ and $\Delta 9$ desaturases. **Annu. Rev. Nutr.** V.24, p.345-376, 2004.

NTAMBI, J.M. The regulation of stearyl-CoA desaturase (SCD). **Prog. Lipid Res**, v.34, p,139–150,1995.

NTAMBI, J.M., BUHROW, S.A., KAESTNER, K.H., CHRISTY, R.J., SIBLEY, E., PARIZA, M., PARK, Y., COOK, M., ALBRIGHT, K., LIU, W.,. Conjugated linoleic acid (CLA) reduces body fat. **FASEB J**, v.10, p. 3227, 1998.

NTAMBI, J.M.,. Regulation of stearyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol. **J. Lipid Res.**, v.40, p.1549–1558, 1999.

O´SHEA M.,DEVERY R., LAWLESS F., **et al.** Milk fat conjugated linoleic acid (CLA) inhibits growth of human mammary MCF7 cancer cells. **Anticancer Res.** v.20, p.3591-3601, 2000

PALOMBO J. D., GANGULY A. J., BISTRAN B. R., **et al.**, – The antiproliferative effects of biologically active isomers of conjugated linoleic acid on human colorectal and prostatic cancer cells. **Cancer Lett** , v.177, p,163-172, 2002.

PARIZA, M.W.; ASHOOR, S.H.; CHU, F.S.; LUND, D.B. Effects of temperature and time on mutagen formation in pan-fried hamburger. **Cancer Letter**; v.7(2-3), p.63-69, 1979.

PARIZA, M.W.; LORETZ, L.J.; STORKSON, J.M.; HOLLAND, N.C. Mutagens and modulator of mutagenesis in fried ground beef. **Cancer Research**, v.43, p. 2444s-2446s, 1983.

PARK, Y.; ALBRIGHT, K.L.; LIU, W.; STORKSON, J.M.; COOK, M.E.; PARIZA, M.W. Effect of conjugated linoleic acid on body composition in mice. **Lipids**, v.32, p.853-858, 1997.

PARK, Y.; STORKSON J.M.; NTAMBI, J.M.; COOK, M.E.; SIH, C.J.; PARIZA, M.W. Inhibition of hepatic stearyl- CoA desaturase activity by trans- 10, cis- 12 conjugated linoleic acid and its derivatives. **Biochemical et Biophysical Acta** , v.1486, p.285-292, 2000.

PARK, Y.; STORKSON, J.M.; ALBRIGHT, K.J.; LIU, W.; PARIZA, M.W. Evidence that the trans- 10, cis-12 isomer of conjugated linoleic acid induces body composition changes in mice. **Lipids**, v.34, p.235- 241, 1999.

PARODI, P.W. Cow's milk fat components as potential anticarcinogenic agents. **J. Nutr.** v.127, p.1055-1060, 1997.

PERFIELD J.W., BERNAL-SANTOS G., OVERTON T.R., BAUMAN D.E.- Effects of dietary supplementation of rumen protected conjugated linoleic acid in dairy cows during established lactation. **J. Dairy Sci.** v.85, p.2609-2617, 2002.

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. **J. Dairy Sci.** v.85, p.2164-2172, 2002.

REGITANO, L.C.A.; COUTINHO, L.L. **Biologia molecular aplicada à produção animal**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 215p, 2001.

REN, J., KNORR, C., HABERMANN, F., FRIES, R., HUANG, L. S., BRENIG, B. Assignment of the porcine stearoyl-CoA desaturase (SCD) gene to SSC14q27 by fluorescence in situ hybridization and by hybrid panel mapping., **International Society for Animal Genetics, Animal Genetics**, v.34, p.465–476, 2003

RISERUS, U.; VESSBY, B.; ARNLOV, J.; BASU, S. Effects of cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid supplementation on insulin sensitivity, lipid peroxidation, and proinflammatory markers in obese men. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.80, n.2, p.279-283, ago. 2004.

ROSATI, A.; VAN VLECK, L.D. Estimation of genetic parameters for milk, fat, protein and mozzarella cheese production in the italian river buffalo population. **Liv. Prod. Sci.**, v.74, n 2, p.185-190, 2002.

SMITH, C. H. Order Ruminantia, In: **The animal kingdom arranged in conformity with its organization** 4. Ed. London: Baron Cuvier, p.384, 1827.

SOLOMON, R., CHASE, L.E., BEN-GHEDALIA, D., BAUMAN, D.E. The effect of non-structural carbohydrate and addition of full fat extruded soybeans on the concentration of conjugated linoleic acid in the milk fat of dairy cows. **J. Dairy Sci.** v.83, p.1322-1329, 2000.

SOYEURT, H.; DEHARENG, F.; MAYERES, P.; BERTOZZI, C.; ENGLER, N. Variation of Δ^9 -desaturase activity in dairy cattle. **J. Dairy Sci.**,v.91, p.2609-2617, 2007

SUN Y, HAO M, LUO Y, LIANG CP, SILVER DL, CHENG C, **et al.** Stearoyl-CoA desaturase inhibits ATP-binding cassette transporter A1-mediated cholesterol efflux and modulates membrane domain structure. **J Biol Chem**; v.278, p.5813–5833, 2003.

TABOR, D.E., XIA, Y.R., MEHRABIAN, M., EDWARDS, P.A., LUSIS, A.J.,. A cluster of stearoyl-CoA desaturase genes, SCD1 and SCD2 on mouse chromosome 19. **Mamm. Genome** v.9, p.341–342, 1998.

TANDON, M.; KUMAR, M.; MOHANIA, D.; SIDDIQUE, R. A.; BEHARE P.V.; VERMA V. 2006. Conjugated Linoleic Acid a Nutraceutical in Dairy products to combat Cancer and Atherosclerosis. In: **47th Annual Conference of Association of Microbiology of India**, p –226, 2006.

TONHATI, H., VASCONCELLOS, B. F. Genetic aspects of productive and reproductive traits in Murrah buffaloes herd in São Paulo, Brasil. In: **6th World Congress Applied to Livestock Production**, Armidale, Australia, p.485-488, 1998.

TONHATI, H.; LIMA, A.L.F. Buffalo Meat : Production and Quality In: **Atti II Congresso Nazionale sull'Allevamento del Bufalo**, Monterotondo, Italy, 2003, v.1, p. 67-79.

VALE, W.G. Perspectivas da bubalinocultura no Brasil e na América Latina. In: **Simpósio Paulista de Bubalinocultura 1.**, Jaboticabal. **Anais...**, Jaboticabal, SP, p.2-26, 1999.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant.** 2. ed. Ithaca: Cornell University, 476p, 1994.

WARD, R.J.; TRAVERS, M.T.; RICHARDS, S.; VERMM, R.G.; SALTER, A.M. Stearoyl-CoA desaturase mRNA is transcribed from a single gene in the ovine genome. **Biochim Biophys Acta**, v.1391, p.145-156, 1998

WEST, D.B.; BIOHM, F.Y.; TRUETT, A.A.; DE LANY, J.P. Conjugated linoleic acid persistently increases total expenditure in AKR/J mice increasing uncoupling protein gene expression. **Journal of Nutrition**, v.130, p.2471- 2477, 2000.

WHITE, S. L., BERTRAND, J. A., WADE, M.R., WASHBURN, S.P. **et al.**, - Comparision of fat acid content of milk from Jersey and Holstein cows consuming pastures or a total mixed ration. **J. Dairy Sci.** v.84, p.2295-2301, 2001.

WONSIL, B.J., HERBEIN, J.H., WATKINS, B. A., - Dietary and ruminally derived trans-C18:1 fatty acids alter bovine milk lipids. **J. Nutr.** v.124, p.556-565, 1994.

YAHYAOU, M.H., SANCHEZ, A., FOLCH, J.M.- Partial nucleotide sequence of the goat stearoyl-CoA desaturase cDNA and gene structure. **J. Anim. Sci.** v.80, p.866-867, 2002.

ZHANG, L., GE, L., PARIMOO, S., STENN, K., PROUTY, S.M. Human stearoyl-CoA desaturase: alternative transcripts generated from a single gene by usage of tandem polyadenylation sites. **Biochem. J.** v.340, p.255-264, 1999.

ZHANG, F., PAN,T., NIELSEN,L.D., MASON,R.J.; Lipogenesis in fetal rat lung: importance of C/EBPalpha, SREBP-1c and stearyl-CoA desaturase **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.** v.30, n. 2, p.174-183, 2004.

ZHENG, Y.,PROUTY, S.M., HARMON, A. **et al.**, - SCD3 – A novel gene of the stearyl-CoA desaturase family with restricted expression in skin. **Genomics** v.71, p.182-191, 2001.

ZICARELLI, L. Management in different environmental condition. **Buffalo J.**, v.10, suppl. 2, p.17-38, 1994.

CAPÍTULO 2. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE DA ENZIMA *Estearoil-Coenzima A Dessaturase* EM BÚFALAS LEITEIRAS.

RESUMO

A atividade biológica do ácido linoléico conjugado (CLA) em seres humanos está diretamente relacionada à prevenção e tratamento de várias doenças, principalmente o câncer. As maiores fontes naturais de CLA, disponíveis para o consumo, são o leite e derivados lácteos. Em ruminantes, altos níveis de secreção do CLA ocorrem em função da síntese endógena que ocorre na glândula mamária, pela ação da enzima ***Estearoil-Coenzima A dessaturase*** (SCD) sobre o ácido vacênico circulante. Neste estudo, a região promotora do gene da SCD de búfalas da raça “Murrah”, foi isolada a partir de bibliotecas gênicas obtidas com a utilização da técnica “Genome Walking”. Os produtos das bibliotecas foram clonados e sequenciados, caracterizando uma região de 588 pb acima do sítio de início de transcrição. A aplicação de softwares específicos para análise das sequências, permitiu a identificação de regiões consenso que atuam como sítios de ligação para fatores de transcrição que agem diretamente na regulação da expressão gênica. Os principais sítios de ligação identificados foram: SREBP-1, NF-Y, NF-1, AP-1, FSE e HNF-4. A sequência da região promotora bubalina obtida neste estudo apresentou homologia com sequências da mesma região descritas para bovinos, ovinos e suínos, indicando similaridade entre os nucleotídeos que as compõem. Este estudo permitiu a caracterização molecular completa da região promotora do gene da SCD em bubalinos leiteiros.

Palavras-chave: CLA, *Bubalus bubalis*, bibliotecas Genome Walker

CHAPTER 2. MOLECULAR CHARACTERIZATION OF Stearoyl CoA Desaturase PROMOTER IN LACTATING BUFFALOES

ABSTRACT

The role of conjugated linoleic acid (CLA) in humans is related to prevention and treatment in a number of diseases, mainly, cancer. Milk and dairy products are the major natural sources of CLA available for human diets. In ruminants, the CLA levels produced occurs in function of the endogenous synthesis on mammary gland by the action of Stearoyl CoA desaturase (SCD) on vaccenic acid. In this study, the promoter region of SCD's gene of Murrah breed buffaloes was isolated from Genome Walker libraries. The amplicons were cloned and sequenced, characterizing 588 bp upstream the transcriptions start site. Analysis with specific software to promoter regions allows the identification of transcription factor binding sites related to gene expression regulation. The putative sequences identified were SREBP-1, NF-Y, NF-1, AP-1, FSE and HNF-4. The core promoter sequence of SCD obtained in this study showed homology with the promoters previously described to bovine, ovine and swine, indicating a high conservation level to the nucleotide sequence. This study allows the complete molecular characterization to the core promoter of SCD gene in dairy buffaloes.

Keywords: CLA, *Bubalus bubalis*, Genome Walker libraries

INTRODUÇÃO

O ácido linoléico conjugado ou CLA é um ácido graxo componente da fração lipídica de alguns alimentos classificados como funcionais. Estes alimentos recebem esta denominação por terem, além de seu valor nutricional, efeitos favoráveis à saúde humana (HEASMAN & MELLENTIN, 2004).

O termo CLA envolve uma variedade de isômeros geométricos e posicionais de um ácido graxo poliinsaturado que possui 18 Carbonos e duas ligações duplas em sua estrutura. Dentre todos os isômeros existentes, o **cis-9, trans-11CLA** apresenta efeitos benéficos associados à prevenção e tratamento de vários tipos de câncer (PARK *et al.*, 2000; IP *et al.*, 2001; MILLER *et al.*, 2001; PALOMBO *et al.*, 2002).

As maiores fontes naturais de CLA disponíveis para o consumo humano encontram-se em produtos oriundos de ruminantes, principalmente o leite e seus derivados (PARODI *et al.*, 1997). Nestes produtos, alguns autores mostraram que até 90% de todo o CLA da fração lipídica corresponde ao **cis-9, trans-11CLA** (O'SHEA *et al.*, 2000; CORL *et al.*, 2001). Esta elevada concentração pode ser atribuída à biossíntese que ocorre na glândula mamária destes animais.

Nesta biossíntese, todo aporte de ácido vacênico - **trans-11C18:1** - biohidrogenado no rúmen, chega à glândula mamária (via síntese "de novo"), onde recebe uma ligação dupla de orientação **cis** na posição 9 em sua cadeia carbônica. A inserção desta ligação dupla que transforma o ácido vacênico em **cis-9, trans-11CLA**, é realizada pela enzima **Estearoil-Coenzima A dessaturase**, ou SCD (NTAMBI, 1999; GRIINARI *et al.* 2000; BENJAMIN *et al.* 2001).

Embora o aumento nas quantidades de CLA secretado na gordura do leite possa ser obtido com alterações na dieta dos animais, vários autores relataram que vacas submetidas à mesma dieta e mantidas sob mesmas condições de manejo apresentaram variações substanciais nos teores produzidos deste ácido graxo (JIANG *et al.* 1996; STANTON *et al.* 1997; KELLY *et al.* 1998; LAWLESS *et al.* 1998; SOLOMON *et al.* 2000; WHITE *et al.* 2001;).

De acordo com PETERSON *et al.* (2002), estas variações entre indivíduos podem ser causadas por alterações na atividade da SCD na glândula mamária que são associadas à sua expressão gênica.

Segundo autores como NTAMBI (1999) e KEATING *et al.* (2006), a expressão do gene da SCD é regulada, predominantemente, na etapa pré-transcricional pela ação das proteínas (fatores de transcrição) que se ligam a sequências consenso de nucleotídeos presentes na região promotora do gene. Estes autores, relatam também que os principais fatores de transcrição envolvidos na regulação da expressão do gene da SCD são: o SREBP-1 (sterol regulatory element binding protein-1), o NF-Y (nuclear factor Y), o NF-1 (nuclear factor-1), o AP-1 (activator protein-1) , o FSE (fat-specific element) e o HNF-4 (hepatocyte nuclear factor-4).

CHAWLA & DEMASON (2003) inferiram que a técnica denominada “Genome Walking” (GW) mostra-se como uma das abordagens mais acuradas para isolar e identificar sequências de DNA desconhecidas, principalmente aquelas que estão acima ou “upstream” do sítio de início de transcrição do gene (como no caso das regiões promotoras). Estes autores relatam ainda que a análise das sequências de regiões promotoras, combinadas com a utilização de ferramentas da bioinformática, permitem avaliações de similaridade entre as informações obtidas e sequências disponíveis em bancos de dados genéticos mundiais, caracterizando assim os sítios de ligação dos fatores de transcrição que irão atuar na regulação do gene de interesse.

Considerando a ausência de dados relacionados à sequência e estrutura da região promotora do gene da SCD em bubalinos, este estudo foi conduzido sob o escopo de isolar e caracterizar esta região utilizando a técnica GW, no intuito de obter informações que assumem um papel inicial importante para inferências sobre a atividade desta enzima na síntese do CLA na glândula mamária.

MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Coletas das amostras e extração do DNA genômico

Foram coletadas amostras de pelos da vassoura da cauda de 214 búfalas da raça Murrah, deste total, 120 são de animais da Fazenda Santa Eliza (Dourado-SP), 60 de búfalas da Fazenda Rio Pardo (Bocaina-SP) e 34 amostras oriundas de animais da Fazenda Paineiras do Ingaí (Sarapuí-SP). Após a ordenha, os animais eram encaminhados ao curral de manejo que havia sido previamente preparado para a realização desta etapa. As amostras foram coletadas com o auxílio de um alicate, sendo posteriormente identificadas e armazenadas em embalagens individuais até a realização dos procedimentos para extração do DNA genômico.

As extrações de DNA das amostras de pelo coletadas foram realizadas a partir da metodologia descrita por LIMA (2003). Cerca de 40 folículos/amostra foram depositados em um tubo de microcentrífuga (1,5 mL) e centrifugados rapidamente. Em seguida, adicionou-se 500 µL de solução TE-TWEEN em cada amostra, seguindo à incubação no banho a 65°C por 1,5 hora, com agitação periódica; após esse período, adicionou-se 2 µL de proteinase K/tubo (concentração de estoque = 600 mg / mL) e incubou-se a 55°C por 6 horas, com agitação periódica e, em seguida, incubou-se a 37°C por uma noite.

Após esses procedimentos, adicionou-se 1 vol de solução PCI para 1 vol de amostra, agitou-se vigorosamente os tubos por 10 segundos em agitador vortex. Posteriormente, centrifugou-se por 10 minutos em força centrífuga relativa (RCF) de $15294 \times g$ e em temperatura de 23°C. O sobrenadante foi transferido para novo tubo.

O volume final desta fase foi de aproximadamente 300 µL. Em seguida foi feita a precipitação do DNA com 1/10 do volume da amostra de acetato de sódio 0,3 M (aproximadamente 30 mL) e etanol absoluto gelado (aproximadamente 1 mL). Após misturar por inversão, os tubos foram colocados no freezer -80°C por 1 hora. Prosseguiu-se com centrifugação a 4°C, por 25 minutos sob $15294 \times g$. O sobrenadante

foi descartado, o DNA remanescente foi completamente seco em temperatura ambiente, e ressuspendido em 40 µL de água milliQ autoclavada.

Após as extrações, as amostras de DNA foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (0,8%), em tampão TEB 1X com brometo de etídio (0,05 µg / mL) a 100V, por aproximadamente 50 minutos. A visualização foi feita em luz ultravioleta (UV) e o gel foi fotodocumentado em aparelho GelLogic (Kodak®), para visualização da integridade do DNA genômico extraído das amostras. Após esta etapa, todas as amostras foram submetidas à avaliação de suas respectivas concentrações utilizando-se o aparelho NanoDrop 2000 - Thermo Scientific.

2.2. Caracterização da região promotora do gene da SCD bubalina com a utilização da técnica GW

Para identificar e caracterizar a região promotora da SCD bubalina, foi utilizado o produto GenomeWalker Universal kit (Clontech Laboratories) em 5 amostras aleatoriamente escolhidas entre as 214 amostras. O princípio de funcionamento desta técnica consiste, inicialmente, na digestão de alíquotas do DNA genômico bubalino (4 alíquotas por amostra de DNA) pelas endonucleases de restrição abrupta: Eco RV, Dra I, Pvu II e Stu I. Cada alíquota digerida foi denominada biblioteca GW, logo, foram obtidas 4 bibliotecas GW por amostra, cada uma com fragmentos do mesmo DNA genômico do respectivo animal, porém com diferentes tamanhos.

Após as digestões com as respectivas enzimas, foi introduzido em cada alíquota, um “adaptador” fornecido pelo fabricante, que se liga às extremidades 5´ de todos os fragmentos, em cada uma das bibliotecas. Com base na sequência nucleotídica do adaptador, são também fornecidos pelo fabricante 2 “primers”, denominados “primers” do Adaptador” (PA1 e PA2). Na Figura 5, é possível observar as sequências de nucleotídeos do adaptador e dos “primers” PA1 e PA2, além da existência de um grupamento amina na extremidade 3` do adaptador GW.

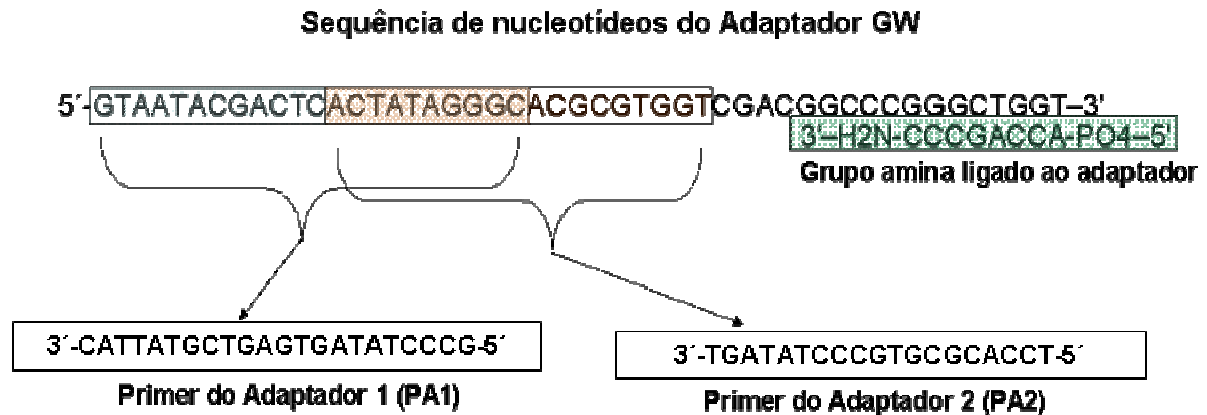


Figura 5. Sequências nucleotídicas do adaptador GW e dos “primers” PA1 e PA2.

Esta amina não só bloqueia a extensão desta extremidade nos fragmentos genômicos em que o adaptador está ligado como também previne a formação de eventuais sítios de ligação de PA1 e PA2 na população de fragmentos dentro de cada biblioteca, ou seja, fica estabelecido que estes “primers” irão se ligar única e exclusivamente ao adaptador GW.

Para complementação da técnica GW, foram sintetizados 2 “primers” específicos para a região promotora do gene da SCD bubalina, construídos de acordo com as informações contidas no manual do usuário do kit GenomeWalker Universal (Clontech Laboratories). Estes “primers” foram obtidos a partir de uma sequência de DNA (GenBank nº:EF122150) que descreve os exons-I e II e o intron I do gene da SCD bubalina. Com base na sequência de nucleotídeos descritos no exon-I foram construídos, com o auxílio do software Gene Runner, dois “primers” denominados “gene específicos”. As sequências de nucleotídeos obtidas para os respectivos “primers” foram:

ALF 1 – 5'GA CAC TGG GAT CAC TTT CTC GGG 3'

ALF 2 – 5'AAC TGA GTG TAG ACT AGT TCC TGA GCC TGC 3.

Após a montagem das bibliotecas, a etapa seguinte foi a realização de duas reações em cadeia da DNA polimerase (PCR), uma primária com os “primers” PA1

(fwd) e ALF1 (rev) seguida de uma PCR secundária ou “aninhada”, onde o “template” da reação foi o produto da PCR primária. A Figura 6 ilustra, de uma forma resumida, as etapas principais do desenvolvimento da técnica GW, assim como as orientações de cada “primer” utilizado.

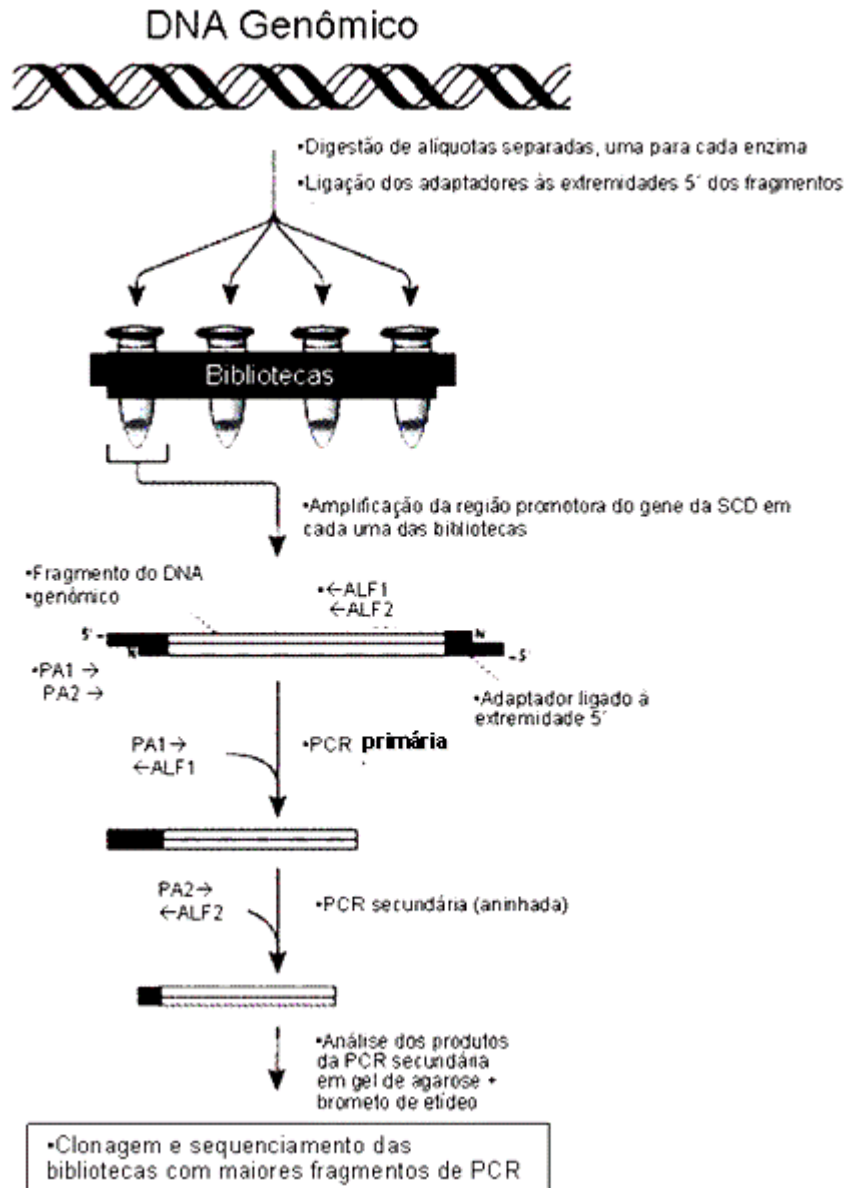


Figura 6. Esquema simplificado das etapas do desenvolvimento da técnica GW.(figura adaptada do manual do fabricante). PA1 e PA2 correspondem aos primers do adaptador; N corresponde à sequência de nucleotídeos a ser isolada e amplificada pelos primers ALF1 e ALF2, respectivamente

Foram feitas reações de digestão do DNA genômico em 5 amostras (repetições) escolhidas aleatoriamente, dando início à montagem de 4 bibliotecas genômicas para cada uma. Nestas bibliotecas foram utilizadas as endonucleases de corte abrupto fornecidas pelo fabricante (***Dra* I**, ***EcoR* V**, ***Pvu* II** e ***Stu* I**). Cinco tubos de 1,5 mL para cada amostra de DNA receberam as rotulações DL1, DL2, DL3, DL4 e controle positivo, respectivamente. Em cada tubo foram adicionados 25 µL de DNA genômico, 8 µL de enzima (uma para cada tubo), 10 µL de tampão para a enzima e 57 µL de água milliQ autoclavada.

Os tubos foram misturados por inversão e incubados a 37°C por 2 horas. Após este período, foram agitados em vortex, vagorosamente, por 5-10 segundos e novamente incubados a 37°C por um período não inferior a 12 horas (overnight). Depois, foram removidas alíquotas de 5 µL por amostra, sendo estas submetidas à eletroforese em gel de agarose (0,8%), em tampão TEB 1X com brometo de etídio (0,05 µg / mL), a 35V, por aproximadamente 90 minutos. A visualização foi feita em luz ultravioleta (UV) e o gel foi fotodocumentado em aparelho GelLogic (Kodak®).

Em cada tubo foram adicionados 95 µL de fenol, seguindo de agitação lenta em vortex por 5-10 segundos. Depois, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL. A este novo tubo foram adicionados 190 µL de etanol 95% gelado, 9,5 µL de acetato de sódio (NaOAc- 3M-pH 4,5) e 20 µg de glicogênio. Os tubos foram então agitados em vortex por 15 segundos e centrifugados a 20817 x g, por 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 100 µL de etanol 80% gelado. Os tubos foram novamente agitados em vortex vagorosamente e centrifugados por mais 10 minutos a 20817 x g. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” ressuspendido em 20 µL de TE (10 / 0,1 - pH 7,5).

Com a purificação das amostras, a etapa seguinte da construção das bibliotecas foi a ligação dos adaptadores GW às extremidades dos fragmentos digeridos pelas enzimas. Nesta fase, 4 µL do produto purificado de cada amostra foram transferidos para novos tubos (com a mesma denominação) de 0,5 mL. Em cada tubo foram adicionados 1,9 µL de adaptadores GW, 1,6 µL de tampão de ligação 10X e 0,5 µL de T4 DNA ligase. As amostras foram incubadas a 16° por 18 horas em termociclador

(Apollo Thermocyclers). Ao final do período de incubação, as amostras foram submetidas a uma temperatura de 70°C por 5 minutos, com o intuito de parar as reações de ligação. A cada tubo foram adicionados 72 µL de TE (10/1, pH 7,5) seguido de agitação lenta em vortex por 10 segundos. A etapa seguinte foi a aplicação da técnica de PCR (polymerase chain reaction) nas bibliotecas utilizando os “primers” sintetizados para o gene da SCD (forward) e aqueles fornecidos no kit GenomeWalker, denominados AP1 e AP2. De maneira simplificada, esta etapa consistiu na realização de duas reações de PCR consecutivas, uma primária, utilizando os “primers” ALF1 (forward) e AP1 (reverse) e outra secundária (aninhada), utilizando os “primers” ALF2 (forward) e AP2 (reverse). O plano de construção das reações de PCR está descrito na Tabela 1.

Tabela 1. Plano de construção das reações de PCR nas bibliotecas GW

Biblioteca	Tubo	Primers primários	Tubo	Primers
DL1 - <i>Dra</i> I	1	ALF1 / AP1	1B	ALF2 / AP2
DL2 – <i>EcoR</i> V	2	ALF1 / AP1	2B	ALF2 / AP2
DL3 - <i>Pvu</i> II	3	ALF1 / AP1	3B	ALF2 / AP2
DL4 - <i>Stu</i> I	4	ALF1 / AP1	4B	ALF2 / AP2

2.3. Clonagem, sequenciamento e análise das sequências obtidas.

Os fragmentos na PCR aninhada da biblioteca DL3 foram clonados em vetor T (p-GEM-T Easy Vector System, Promega®). A reação de ligação do produto de PCR ao vetor constituiu-se de 1µL de T4 DNA ligase (3 U/µL), 2 µL de tampão 1X da T4 DNA ligase, 1 µL do pGEM-T (vetor plasmidial) e aproximadamente 200 ng do produto amplificado, constituindo um volume final de 10 µL. Esta reação permaneceu em termociclador a 4°C por 16 horas.

Após a ligação, os plasmídios (vetores) recombinantes foram inseridos para transformação de células competentes de *Escherichia coli* linhagem DH10B, previamente preparadas no Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada do Departamento de Biologia Aplicada a Agropecuária/ Unesp Jaboticabal. Nesse processo, aos 10 µL do material ligado foram adicionados a 200 µL de células competentes (*E. coli*-DH10β) em tubo de 1,5 mL estéril posteriormente incubado em gelo por 30 minutos, seguindo-se de incubação em banho-maria por 90 segundos a 42°C, e novamente incubação no gelo por 2 minutos.

Em seguida, as células foram transferidas para tubos Falcon de 15 mL e foram adicionados 800 µL de meio SOC com posterior incubação por 1 hora a 37°C com agitação de 110 rpm.

Após esse período, foram feitas culturas dessas bactérias semeando 100 µL das células em placa de Petri contendo meio LB sólido suplementado com 50 µL de ampicilina (100.000 µg/mL) por, aproximadamente, 16 horas a 37°C, para posterior seleção de colônias transformadas. Sobre o meio de cultura das placas de Petri espalhou-se, previamente, 70 µL de X-Gal (50 mg/mL).

As colônias de bactérias transformadas e não transformadas foram diferenciadas pelas colorações branca e azul, respectivamente, sendo as colônias brancas então coletadas com palitos estéreis e depositadas em microplacas com 96 poços, contendo 100 µL de meio LB suplementado com 50 µL de ampicilina (100.000 µg/mL). As placas foram seladas e mantidas na estufa à 37°C por 22 horas. Posteriormente, aos clones foram adicionados 100 µL de glicerol 40% para estocagem dos mesmos em freezer - 80°C. Alíquotas de 10 µL foram retidas das culturas permanentes e adicionadas a 1 mL de meio LB líquido com 50 µL de ampicilina em novas microplacas de 96 poços, seguindo de incubação a 37°C por 16 horas com agitação de 200 rpm. Essas culturas foram utilizadas na minipreparação de DNA plasmidial pelo método de lise alcalina (SAMBROOK & RUSSELL, 2001).

Após a extração do DNA plasmidial, foi feita a confirmação da inserção dos fragmentos nos vetores. Em uma reação de digestão, 8 µL do DNA plasmidial extraído foram misturados a 2 µL de tampão 10X e 0,5 µL da enzima de restrição *EcoR* I

(Invitrogen®). Os produtos da digestão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TEB 1X com brometo de etídio (0,05 µg / mL) a 75V, por aproximadamente 2 horas. A visualização foi feita em luz ultravioleta (UV) e o gel foi fotodocumentado em aparelho GelLogic (Kodak®)

Foram selecionadas 5 amostras (repetições) do DNA plasmidial extraído correspondente à biblioteca DL3, após a clonagem, totalizando 10 amostras a serem sequenciadas - 5 fwd com “primer” ALFII e 5 rev com “primer” PA2. As análises de sequenciamento destas amostras, a partir das extremidades 5´ e 3´ foram realizadas pelo Serviço de sequenciamento de DNA do Centro de Estudos do Genoma Humano (CEGH), ligado ao Instituto de Biociências da USP. As leituras foram realizadas no aparelho MegaBACE 1000 Automated Sequencer (GE Healthcare), um sistema de análise de DNA de 96 capilares. As reações de sequenciamento foram realizadas de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante, utilizando o DYEnamic ET Dye Terminator Kit (com Thermo Sequenase™ II DNA Polimerase). As sequências foram obtidas com auxílio do software Sequence Analyser utilizando o Base Caller Cimarron Version 3.12.

As sequências de DNA obtidas foram submetidas à consulta de similaridade de nucleotídeos com sequências depositadas no GenBank, em acesso ao endereço eletrônico www.ncbi.nlm.nih.gov do NCBI (National Center for Biotechnology Information). A ferramenta utilizada para esta consulta foi o BLASTn – Basic Local Alignment Search Tools, disponível neste mesmo endereço.

As análises de edição envolvendo o pareamento dos dados, montagem de sequências contíguas e caracterização das sequências nucleotídicas, foram realizadas utilizando ferramentas disponíveis nos “softwares”: CodonCode Aligner® **trial-version1.4.6**; CLC Free Workbench 4; CAP3; BioEdit, CONSED e GenScan (<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>).

Para a avaliação das sequências consenso, características de regiões promotoras de genes, foram utilizadas as ferramentas disponíveis no software Genomatix MatInspector V 2.2 (QUANDT *et al.* 1995), que utiliza matrizes presentes na

base de dados TRANSFAC 6.0, desenvolvida por WINGENDER *et al.* (2000) para tal avaliação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme ilustrado na Figura 7, as digestões das bibliotecas DL1, DL2, DL3 e DL4 foram realizadas com êxito. Os arrastes observados nos resultados desta etapa, estão em pleno acordo com o manual do fabricante, indicando total eficiência das enzimas para cada biblioteca na digestão total do DNA genômico. Após a digestão das bibliotecas, foram realizadas reações para limpeza e purificação do material digerido.

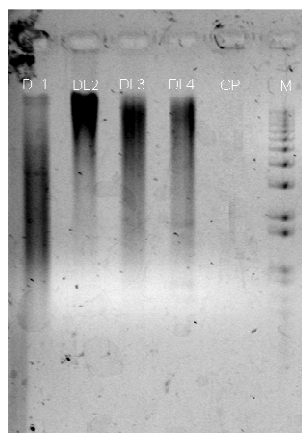


Figura 7. Foto representativa das reações de digestão na montagem das bibliotecas GW. Cp=controle positivo, M= marcador de peso molecular 1Kb plus DNA ladder.

As reações de PCR primárias foram realizadas num volume total de 50 μ L, constituídos por 2 μ L de cada biblioteca, 40 μ L de água milliQ, 5 μ L de tampão para PCR, 1 μ L de dNTP, 1 μ L de cada "primer" e 1 μ L de Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen). Os tubos foram colocados em termociclador de acordo com o seguinte programa: 7 ciclos a 94°C por 25 segundos; 72°C 3 minutos; 32 ciclos a 94°C por 25 segundos; 67°C 3 minutos e um ciclo final a 67°C por 7 minutos. Após as reações

primárias, 5 μ L de cada tubo foram aliquotados e aplicados em gel de agarose a 1,5%. Os resultados da PCR primária podem ser observados na Figura 8.

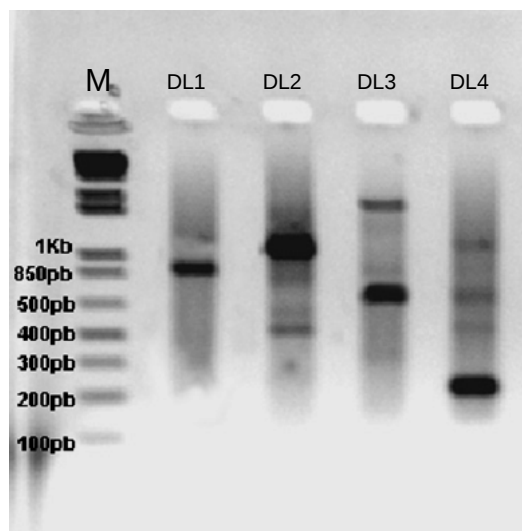


Figura 8. Foto representativa da reação de PCR primária das bibliotecas GW. M= marcador de peso molecular 1Kb plus DNA ladder, gel de agarose a 1,5%

Pode-se observar, que foram gerados fragmentos primários em todas as bibliotecas. Os resultados obtidos na PCR primária mostram-se perfeitamente de acordo com os esperados, de acordo com o manual do fabricante, indicando sucesso na aplicação da técnica para a região estudada do gene da SCD.

Para realização da PCR secundária (aninhada), 1 μ L dos fragmentos primários das quatro bibliotecas foram transferidos para novos tubos de 0,5ml e diluídos em 49 μ L de água milliQ. As reações secundárias de PCR foram feitas em um volume final de 50 μ L constituídos por 2 μ L do produto da PCR primária diluído, 40 μ L de água milliQ, 5 μ L de tampão para PCR, 1 μ L de dNTP, 1 μ L de cada “primer” e 1 μ L de Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen). Os tubos foram colocados em termociclador de acordo com o seguinte programa: 5 ciclos a 94°C por 25 segundos / 72°C por 3 minutos; 20 ciclos a 94°C por 25 segundos / 67°C por 3 minutos e um ciclo final a 67°C por 7 minutos.

Após o término dos ciclos, 5 μ L de cada amostra foram aplicados em gel de agarose a 1,5%. Os resultados podem ser observados na Figura 9.

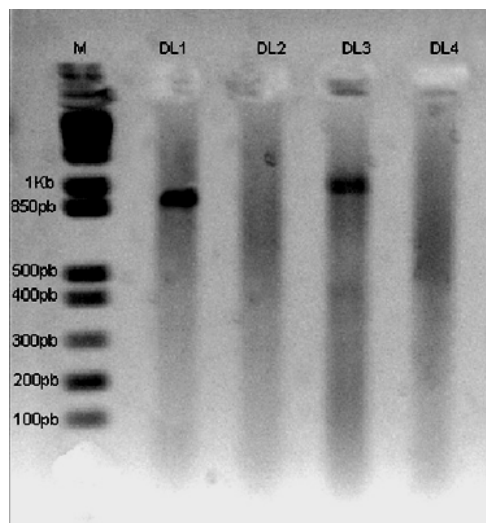


Figura 9. Foto representativa da reação de PCR secundária das bibliotecas GW. M= marcador de peso molecular 1Kb plus DNA ladder, gel de agarose a 1,5%.

Pode-se observar que a utilização dos “primers” ALF1 e ALF2, especificamente desenhados para a região promotora do gene da SCD proporcionou, ao final do uso da técnica GenomeWalker, a amplificação de um fragmento específico de aproximadamente 900 pb na biblioteca 1 e de aproximadamente 1100 pb na biblioteca 3. Este resultado pode ser justificado pelo aumento na especificidade da PCR aninhada, permitindo a identificação da sequência alvo da região promotora do gene da SCD apenas nestas duas bibliotecas.

Seguindo as recomendações do manual do kit Genome Walker, foram consideradas apenas as bibliotecas que apresentaram os fragmentos de maior tamanho após a PCR secundária, logo, para as reações de clonagem e seqüenciamento, foram utilizadas apenas as amostras da biblioteca DL3. Estas etapas foram realizadas com êxito, obtendo-se 8 repetições para cada um dos “primers” ALFII (fwd) e PA2 (rev). As sequências obtidas foram então editadas e alinhadas no **software** CodonCode Aligner® em uma só sequência final (**contig**), enviada então ao BLASTn para conformação e identificação da similaridade com outras espécies.

Deve-se considerar, que a técnica GW monta a fita dupla de DNA a partir dos “primers” específicos (ALF I e ALF II) e esta síntese só termina quando a enzima **Taq** DNA polimerase encontra o sítio de terminação com o radical amina dos adaptadores. Logo, pode-se inferir que as sequências obtidas na biblioteca DL3, englobam a região promotora (sequência alvo) mais o que estiver acima dela (upstream). Partindo deste conceito, foram realizadas análises (conjuntas ao BLASTn) utilizando o software GenScan, que utiliza um algoritmo de predição multifatorial baseado em cadeias de Markov, com o objetivo de isolar apenas os nucleotídeos referentes à região promotora do gene da SCD bubalina. Ao final destas análises, foi possível chegar a uma sequência final da região promotora da SCD bubalina com 588 nucleotídeos

Conforme mostra a Tabela 2, a maior homologia entre a sequência obtida e aquelas disponíveis no GeneBank, foi com a região promotora do gene da SCD na espécie bovina (94%). Este resultado nos permite inferir que a sequência de nucleotídeos obtida pela aplicação da técnica GW, corresponde à região promotora do gene da SCD em búfalos.

Tabela 2. Resultados obtidos pela análise de similaridade de sequências de nucleotídeos da região promotora do gene da SCD bubalina com as sequências da espécie bovina disponíveis no GenBank.

ESPÉCIE	SIMILARIDADE	AUTORES	Nº DE ACESSO NO GenBank
<i>Bos taurus</i>	94%	TANIGUCHI <i>et al.</i> (2004)	AB106355
<i>Sus scrofa</i>	84%	REN <i>et al.</i> (2004)	AY487830.1
<i>Bos taurus</i>	94%	KEATING <i>et al.</i> (2006)	AJ555480.2
<i>Ovis aries</i>	91%	GARCIA <i>et al.</i> (2009)	FJ513370.1

Com a utilização das ferramentas disponíveis no software MatInspector, foi possível não só identificar os fatores de transcrição presentes na sequência de nucleotídeos obtida neste estudo, como também montar um alinhamento comparativo com uma sequência da região promotora do gene da SCD bovina descrita por KEATING ***et al.*** (2006). Os resultados obtidos com este alinhamento estão dispostos na Figura 10.

		-378 SREPB	-363 NF-Y/NF-1
Bubalus bubalis	GGGGTAGTGAGCAGCACGCTGCAGAGGGAAC	<u>ATCAGATTGCG</u> CCGAG	<u>GCCAATGGCAAC</u> CGG
Bos Taurus	GGGGTAGTGAGGAGCTCGCGGCAGAGGGAAC	<u>ATCAGATTGCG</u> CCGAG	<u>GCCAATGGCAAC</u> CGG
	*****	***	*****
	-338 NF-1	-319 NF-Y/AP-1	
Bubalus bubalis	CAGGACGAGGT	<u>GGCA</u> CCAAATTCCTTCGG	<u>CCAAT</u> GACGCGCCAGAGTCTACAGAAGCCC
Bos Taurus	CAGGACGAGGT	<u>GGCA</u> CCAAATTCCTTCGG	<u>CCAAT</u> GACGCGCCAGAGTCTACAGAAGCCC
	*****	*****	*****
Bubalus bubalis	ATTAGCATTTCCCCAGGGGCAGGGGCAGAGGCAGGGGCTTCCCATTAGTAAGCCGCGGTC		
Bos Taurus	ATTAGCATTTCCCCAGGGGCAGGGGCAGAGGCAGGGGC	-TGC	GCGCGCCAAGCCGCGGTC
	*****	*	*****
Bubalus bubalis	TGTGTGCAGCATCCAGTTCTTGCTTCTTCTGGCCCCCAGCACGCCTCGGCGCTCTGTCTC		
Bos Taurus	TGTGTGCAGCATCCAGTTCTTGCTTCTTC	-GGCCCCCAGCACGCCTCGGCGCTCTGTCTC	
	*****	*****	*****
		-120 HNF-4	
Bubalus bubalis	CTCCCCTCTCCCGCCCAT	-CGGATCTCCACGGTGAGCCA	ACTCTGCGCA <u>CTTT</u> GCCCCT
Bos Taurus	CTCCCCTCTCCCGCCCATGCGGATCTCCACGGTGAACCA	ACTCTGCGCA <u>CTTT</u> GCCCCT	
	*****	*****	*****
	-110 NF-1	-96 TATA	-87 FSE
Bubalus bubalis	<u>TGTTGGCA</u> ACTGAAT	<u>AAAAAG</u>	-GGGCTGAGGAAATACGGGACACAGTCA
Bos Taurus	<u>TGTTGGCA</u> AC-GAAT	<u>AAAAAGAGGT</u>	<u>CTGAGGAAAT</u> ACGGGACACAGTCA
	*****	*****	*****
	-44 TATA		+1
Bubalus bubalis	GCTAGCC <u>TTTAAAT</u> CCCCAGCTACAGCAGGT	CGGGTCCGGACACCGGTCCAG	CGCGCACC
Bos Taurus	GCTAGCC <u>TTTAAAT</u> CCCCAGC-ATAGCAGGT	CGGGTCCGGACACCGGTCCAG	CGCGCACC
	*****	*****	*****
Bubalus bubalis	GTGCATGCGGAAGGTCCCGAGCGCAGCTGCCGCGGATCATCCACGCAAA		
Bos Taurus	GTGCA-GCGGAAGGTCCCGAGCGCAGC-GCTGCGGATC	-CCCACGCAAA	
	*****	*****	*****

Figura 10. Alinhamento da sequência bubalina obtida na biblioteca DL3 com a sequência parcial da região promotora da SCD bovina (AJ555480.2). Os números com as respectivas posições dos fatores de transcrição na sequência bubalina estão acima das mesmas. Os fatores de transcrição estão em negrito / sublinhados, e foram obtidos a partir do banco de dados TRANSFAC 6.0 com auxílio do software MatInspector. +1 corresponde ao sinal de início de transcrição. *corresponde a nucleotídeos idênticos para as regiões promotoras da SCD nas duas espécies comparadas.

A comparação entre as duas espécies mostra a homologia para os componentes das sequências consenso indicadas. Na região promotora bubalina, os fatores TATA (5'-TTTAAAT-3' e 5'-TAAAA-3') estão localizados nas posições -44 e -96, respectivamente.

O fator específico de gorduras FSE (5'-CTGAGGAAA-3') foi localizado na posição -87 e os sítios de ligação dos fatores de transcrição AP-1 (5'-GTCA-3'), NF-1 (5'-TGTTGGCA-3') e HNF4 (5'-CTTT-3'), estão nas posições -67 e -319; -110 e -338; -120, respectivamente. Estes resultados corroboram NTAMBI *et al.* (1988) e ZHANG *et al.* (2001), que caracterizaram posições semelhantes para estas sequências sinalizadoras na região promotora da SCD em ratos e humanos, respectivamente.

Os sítios de ligação para os fatores de transcrição SREBP-1 (5'-ATCAGATTGCG-3') e CAAT-box / NF-Y (5'-CCAAT-3' nuclear factor Y) foram localizados nas posições -378, -363 e -319, respectivamente. Estes fatores de transcrição constituem o principal mecanismo de regulação da expressão da SCD, por agirem diretamente em resposta aos níveis de ácidos graxos mono e poliinsaturados, (NTAMBI *et al.*, 1988).

As sequências completas de nucleotídeos que compõem a região promotora do gene da SCD bubalina estão disponíveis no GenBank sob os números de acesso: GQ336861 e GQ336862. Os resultados obtidos no presente estudo permitem inferir que a aplicação da GW permitiu isolar e caracterizar completamente a região promotora da enzima SCD na espécie bubalina.

REFERÊNCIAS*

BENJAMIN A. C., BAUNGARD, L. H., DWYER, D. A., GRIINARI, J. M., PHILLIPS, B. S., BAUMAN, D.E., The role of Δ^9 -desaturase in the production of cis-9, trans-11 CLA. **Journal of Nutritional Biochemistry** v.12, p.622-630, 2001.

CHAWLA, R., DEMASON, D. Genome walking in pea: man approach to clone unknown flanking sequences. **Pisum Genetics** v.35, p.1-3, 2003.

CORL, B. A.; BAUNGARD, H.; DWYER, D. A., **et al.**- The role of Δ^9 desaturase in the production of cis-9 trans-11 CLA. **J. Nutr. Biochem.** v.12, p.622-630,2001.

GARCIA M.,GUTIERREZ-GIL B., GARCIA-GAMEZ E. ARRANZ J.J. Genetic variability of the Stearoyl CoA desaturase gene in sheep. **Mol. Cell. Probes** v.23, n.2, p.107-111, 2009.

GRIINARI, J. M., CORL, B. A., LACY, S. H. , CHOUINARD, P. Y., NURMELA, K. V. V., BAUMAN, D. E. Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating cows by Δ^9 -desaturase. **J. Nutr.** v.130, p.2285-2291, 2000.

HEASMAN, M. and MELLENTIN, J. The functional foods revolution healthy people, healthy profits? **Journal of Cleaner Production**, v.12, n.5, p. 527-529, 2004.

IP, C. CLA and cancer prevention. In: International Conference on CLA 1. Alesund,Norway 2001. Proceedings Alesund: **Natural ASA**, p.8, 2001.

JIANG J, BJOERCK L, FONDEN R, EMANUELSON M. Occurrence of conjugated cis-9, trans-11-octadecadienoic acid in bovine milk: Effects of feed and dietary regimen. **J Dairy Sci** v. 79, p.438–445, 1996

* ABNT, 2002

KEATING A.F., KENNELLY J.J., ZHAO F.Q. Characterization and regulation of the bovine stearoyl-CoA desaturase gene promoter. **Biochem Biophys Res Commun.** v.344, n.1, p.233-40, 2006.

KELLY ML, BERRY JR, DWYER DA, GRIINARI JM, CHOUINARD PY, **et al.** Dietary fatty acid sources affect conjugated linoleic acid concentrations in milk from lactating dairy cows. **J Nutr.** v.128, p.881–885, 1998.

LAWLESS ML, MURPHY JJ, HARRINGTON D, DEVERY R, STANTON C Elevation of conjugated cis-9, trans-11-octadecadienoic acids in bovine milk because of dietary supplementation. **J Dairy Sci** v.81, p.3259–3267, 1998.

LIMA, SILMARA PAULA GOUVEIA DE., “Estudo do polimorfismo da região promotora do gene do hormônio de crescimento bovino (bGH), em rebanhos Nelore selecionados para peso pós-desmama.” **Dissertação (mestrado)** – Universidade Estadual Paulista, FCAV, Jaboticabal, 2003.

MILLER A., STANTON C., **et al.**, Modulation of arachidonic acid distribution by conjugated linoleic acid isomers and linoleic acid in MCF-7 and SW480 cancer cells. **Lipids** v. 36, p. 1161-1168, 2001.

NTAMBI J.M., BUHROW S.A., KAESTNER K.H., CHRISTY R.J., SIBLEY E., **et al.** Differentiation-induced gene expression in 3T3-L1 preadipocytes. A second differentially expressed gene encoding Stearoyl-CoA desaturase. **J Biol Chem** v.263, p.17291–17300, 1988.

NTAMBI, J.M. Regulation of stearoyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol. **J. Lipid Res.** v. 40, p.1549–1558, 1999.

O'SHEA M., DEVERY R., LAWLESS F., **et al.**, Milk fat conjugated linoleic acid (CLA) inhibits growth of human mammary MCF7 cancer cells. **Anticancer Res.** v.20, p.3591-3601, 2000.

PALOMBO J. D., GANGULY A. J., BISTRAN B. R., **et al.** The antiproliferative effects of biologically active isomers of conjugated linoleic acid on human colorectal and prostatic cancer cells. **Cancer Lett** v.177, 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 Res.** v.20, p.669-676, 2000.

PARODI, W.P. Cow's milk fat components as potential anticarcinogenic agents. **J. Nutr.** v.127, p.1055-1060, 1997.

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. **J. Dairy Sci.** v.85, p.2164-2172, 2002.

QUANDT K., FRECH K., KARAS H., WINGENDER E., WERNER T. Matind and Matinspector—new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. **Nucleic Acids Res.** v.23, p.4878–4884, 1995

REN J., KNORR C., HUANG L., BRENIG B. Isolation and molecular characterization of the porcine Stearoyl CoA desaturase gene. **Gene** v.340, p.19-30, 2004

SAMBROOK J, RUSSELL D. Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3.ed. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, New York, NY, USA, 2001.

SOLOMON, R., CHASE, L.E., BEN-GHEDALIA, D., BAUMAN, D.E. The effect of non-structural carbohydrate and addition of full fat extruded soybeans on the concentration

of conjugated linoleic acid in the milk fat of dairy cows. **J. Dairy Sci.** v.83, p.1322-1329, 2000.

STANTON, C., NORDGREN, M., ROSBERG, E., FITZGERALD, G., DEVERY, R., ROSS, R.P. Human Intestinal Isolates with Ability to Efficiently Synthesis CLA. In: International Conference on CLA 1. Alesund, Norway, 2001. Proceedings Alesund: **Natural ASA**, p. 17, 2001

TANIGUCHI M., UTSUGI T., OYAMA K.,MANNEN H. **et al.** Genotype of Stearoyl CoA desaturase is associated with fatty acid composition in Japanese Black cattle **Mamm. Genome** v.14, p.142-148, 2004

WHITE, S. L., BERTRAND, J. A., WADE, M.R., WASHBURN, S.P. **et al.**, Comparison of fat acid content of milk from Jersey and Holstein cows consuming pastures or a total mixed ration. **J. Dairy Sci.** v.84, p.2295-2301, 2001.

WINGENDER E., CHEN X., HEHL R., KARAS H., LIEBICH I, **et al.** TRANSFAC: an integrated system for gene expression regulation. **Nucleic Acids Res.** v.28, p.316–319, 2000.

ZHANG L., LAN G.E., STENN K., PROUTY S.M. Isolation and characterization of the human Stearoyl-CoA desaturase gene promoter: requirement of a conserved CCAAT cis-element. **Biochem J** v.357, p.183–193, 2001

CAPÍTULO 3. IDENTIFICAÇÃO DE POLIMORFISMOS NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE DA ENZIMA *Estearoil-Coenzima A Dessaturase* E SUAS ASSOCIAÇÕES COM AS QUANTIDADES DE ÁCIDOS GRAXOS PRODUZIDOS NO LEITE DE BÚFALAS.

RESUMO

Considerando a possível ocorrência de variações na região promotora do gene da SCD, este estudo foi conduzido com o intuito de identificar polimorfismos nesta região, fazendo uso da técnica PCR-SSCP. Foram avaliadas 214 búfalas da raça Murrah. Amplicons de 588 pb foram obtidos em reações de PCR utilizando-se um par de “primers” desenhados a partir da sequência correspondente à região promotora da SCD bubalina. As análises de SSCP permitiram a identificação de três padrões de migração diferentes, caracterizando os genótipos AA, AB e BB. A avaliação das sequências obtidas destes genótipos, possibilitou a determinação de duas variantes distintas (A e B) e a identificação de polimorfismos pontuais (SNPs) que determinaram a variação nos padrões de migração observados. Estes polimorfismos foram caracterizados por uma deleção na posição 296 (citosina na variante A) e duas substituições de citosinas por adeninas, nas posições 324 e 409 da variante B em relação à variante A. Foram quantificados os teores de ácidos graxos produzidos na gordura do leite de 54 animais, durante 10 meses nos anos de 2003 e 2004. As análises de associação foram realizadas em um modelo linear de medidas repetidas. Os resultados obtidos neste estudo mostraram que a técnica PCR-SSCP, aliada ao sequenciamento de nucleotídeos, permitiu a caracterização de polimorfismos na região promotora da enzima ***Estearoil-Coenzima A dessaturase*** na espécie ***Bubalus bubalis***. Os genótipos obtidos foram associados aos teores de ácidos graxos produzidos no leite, onde as maiores médias dos ácidos graxos C14:0, ***cis***-9 C14:1 e ***cis***-9 C18:1 foram associadas aos animais com genótipo AA para a região estudada. A sequência de nucleotídeos da variante B, com os ***loci*** polimórficos descritos pela primeira vez nesta espécie, foi depositada no GenBank e encontra-se disponível pelo número de acesso GQ336862.

Palavras-chave: CLA, PCR-SSCP, Câncer

CHAPTER 3. POLYMORPHISM IDENTIFICATION OF *Stearoyl-CoA Desaturase* PROMOTER REGION AND ITS ASSOCIATION WITH MILK FATTY ACID CONTENT OF LACTATING BUFFALOES.

ABSTRACT

Considering the existence of variations on SCD promoter, this study was carried out with the intent to identify polymorphisms at this region using PCR-SSCP. Were evaluated 214 buffaloes from Murrah breed. Amplicons of 588 bp in length were obtained by PCR with primers designed from bubaline SCD promoter. SSCP analysis allowed identifying three different migration patterns, AA, AB and BB, respectively. Evaluations of the obtained sequences from cloning these polymorphic samples lead to characterize two distinguished variants (A and B) and the identification of SNPs, which determine the variations of migration patterns. These SNPS were determined by a deletion at position 296 and two substitutions of Cytosine by Adenine, at positions 324 and 409 of variant B. The content of fatty acid was analyzed from milk fat of 54 animals during ten months, between years 2003 and 2004. Association analyses were made by a mixed linear model with repeated measures. The results obtained from this study showed that PCR-SSCP, allied to DNA sequencing, allow the characterizations of polymorphisms on *Bubalus bubalis* SCD promoter. The obtained genotypes were associated with milk fatty acids content, where higher mean level of fatty acids C14:0, *cis*-9 C14:1 and *cis*-9 C18:1 were associated to animals with AA genotype for the studied region. The nucleotide sequence of variant B, with polymorphic *loci* described for the first time on this specie, was submitted to GenBank under the accession number GQ336862.

Keywords: CLA, PCR-SSCP, Cancer

INTRODUÇÃO

O termo ácido linoléico conjugado ou CLA, é utilizado para descrever um ácido graxo com 18 carbonos e duas duplas ligações conjugadas, isto é, separadas por uma ligação simples (BAUMAN *et al.* 1999). Dentre todos os isômeros geométricos e posicionais do CLA, o **cis-9, trans-11CLA** atraiu muita atenção da comunidade científica nas últimas décadas, devido a seu potencial anticarcinogênico. Estudos envolvendo modelos animais (LIEW *et al.* 1995; IP *et al.* 1996) e modelos in vitro utilizando células humanas de tecidos da glândula mamária, cólon e próstata (VISONNEAU *et al.* 1997; CESANO *et al.* 1998; PARK *et al.* 2000; MILLER *et al.* 2001; PALOMBO *et al.* 2002), comprovaram os efeitos benéficos do CLA na prevenção e tratamento do câncer.

As frações lipídicas de alimentos oriundos de ruminantes, principalmente no leite e seus derivados, representam as maiores fontes naturais do **cis-9, trans-11CLA** disponíveis para o consumo em dietas para humanos. Tal fato é atribuído à biossíntese deste ácido graxo que ocorre na glândula mamária pela ação da enzima **Estearoil-Coenzima A dessaturase** (SCD). Na glândula mamária, esta enzima realiza uma dessaturação oxidativa, inserindo uma ligação dupla de configuração cis entre os carbonos 9 e 10 do ácido vacênico (trans-11 C18:1) circulante.

A adoção de medidas visando incrementar a produção de CLA na gordura do leite produzido deve levar em consideração dois fatores importantes. O primeiro envolve alterações na dieta dos animais, com objetivo de aumentar o aporte de ácido vacênico à glândula mamária. Isto é possível, pelo aumento na proporção de alimentos volumosos na composição da dieta ou com a utilização de suplementos que contenham óleos ricos em ácidos poliinsaturados como o linoléico e o linolênico.

O segundo fator, de acordo com CHILLIARD *et al.* (2000) e GRIINARI *et al.* (2000), considera diferenças nos níveis de expressão e atividade da SCD nos tecidos da glândula mamária. A estas diferenças, são atribuídas variações nos teores de CLA secretados no leite de animais, submetidos às mesmas condições de nutrição e manejo. Alguns autores, como PETERSON *et al.* (2002) e CONTE *et al.* (2006),

inferiram que estas variações podem ser, em parte, ocasionadas por diferenças genéticas na região promotora que regula a expressão gênica da SCD.

Segundo KARIJORD *et al.* (1982) e BOBE *et al.* (2003), esta variabilidade genética pode ser suficiente para aumentar as quantidades de CLA no leite, pelo uso da seleção. Entretanto, MOIOLI *et al.* (2007) e SOYEURT *et al.* (2006), sugerem que este tipo de seleção não é muito utilizado, devido principalmente, à demanda de tempo e ao custo das análises de ácidos graxos por cromatografia gasosa.

Corroborando estes autores, MELE *et al.* (2007), relataram que programas tradicionais de seleção, baseados em estimações dos valores genéticos dos animais a partir de informações fenotípicas, podem ser limitados pelo custo elevado de obtenção de dados para algumas características.

A identificação de marcadores genéticos relacionados com a produção de CLA, pode ser uma alternativa auxiliar à seleção, pois, segundo HAYWARD *et al.* (1994), se um gene (ou conjunto de genes) é localizado por um marcador de fácil identificação associado a *loci* de características quantitativas, a seleção para este marcador será mais eficiente do que para o próprio fenótipo.

Autores como TANIGUCHI *et al.* (2003) e SOYEURT *et al.* (2006), referem-se ao gene da SCD de ruminantes como um candidato primário, a ser utilizado em objetivos de seleção para alterar o perfil de ácidos do leite, aumentando assim, a quantidade de CLA produzido no leite.

Dentre as técnicas utilizadas para identificar polimorfismos a serem utilizados como marcadores genéticos, a PCR-SSCP (reação em cadeia da DNA polimerase – polimorfismo de conformação das cadeias simples de DNA) consiste em submeter fragmentos de DNA, previamente amplificados por PCR, a uma reação físico-química que irá quebrar as pontes de hidrogênio da fita dupla, separando-a duas moléculas fita-simples. A formamida presente na reação dificulta a formação das pontes de Hidrogênio, impedindo que a renaturação ocorra antes do início da eletroforese e aumentando a especificidade do pareamento por interações intramoleculares.

A ocorrência de uma simples mudança (ou deleção) de base nitrogenada em uma das fitas simples, pode gerar um rearranjo diferenciado na cadeia que irá alterar o

padrão de migração eletroforético das moléculas, evidenciando o polimorfismo (HAYASHI, 1991; TELENTI *et al.* 1993).

De acordo com SUNNUCKS *et al.* (2000), a PCR-SSCP apresenta uma combinação de características bastante favoráveis na detecção de variações em sequência de DNA. Talvez, as mais importantes sejam a simplicidade e a alta sensibilidade do método em detectar polimorfismos em fragmentos de 10pb a 800pb. HAYASHI (1991) considerou que a acurácia elevada desta técnica - quando combinada à eletroforese em gel de acrilamida - permite uma redução nos volumes das reações e nas concentrações de reagentes, o que diminui o custo por amostra, no caso de avaliações em larga escala.

Este autor infere ainda que, após a identificação dos alelos, estes podem ser sequenciados para a localização pontual das mutações que os definem, o que garante resultados rápidos e obtidos de forma eficiente. MELE *et al.* (2007) utilizaram a PCR-SSCP no exon-5 do gene da SCD em bovinos da raça Holandesa e mostraram que, a detecção de polimorfismos por esta técnica em conjunto com o sequenciamento dos genótipos obtidos, permitiram a identificação de 2 alelos distintos (A e V) para esta região.

Uma abordagem estatística bastante utilizada, quando se busca associar marcadores genéticos a *loci* de características quantitativas, é considerar os efeitos dos genótipos como fixos em um modelo linear, realizando assim, análises para a obtenção de suas médias. No caso de características ligadas à produção de leite, estas análises podem ser desenvolvidas em um modelo que envolva medidas que se repetem no tempo.

Segundo LITTELL *et al.* (1998), medidas repetidas de uma característica - como a produção de ácidos graxos durante a lactação - avaliadas no mesmo animal, são correlacionadas entre si. A correlação e a variância dessas medidas podem variar ao longo do tempo, produzindo uma estrutura de (co)variância complicada, a qual requer métodos estatísticos especiais para a análise. Estes autores inferiram ainda que, a escolha da estrutura de (co)variância para os resíduos é importante porque os erros-

padrão das médias são dependentes desta escolha e, caso se opte por uma estrutura inadequada, estes erros podem ser enviesados.

O procedimento MIXED do SAS (SAS, 2000), disponibiliza aproximadamente 40 tipos de estruturas de (co)variâncias residuais e critérios para escolha da melhor estrutura para determinado conjunto de dados. Estes critérios, em geral, incluem o valor da função de máxima verossimilhança restrita, o número de dados analisados e de parâmetros a serem estimados.

As principais conversões estruturais em ácidos graxos, realizadas pela SCD na glândula mamária são: C14:0 em **cis**-9, C14:1; C16:0 em **cis**-9, C16:1; C18:0 em **cis**-9, C18:1 e **trans**11, C18:1 em **cis**-9, **trans**-11/CLA (NTAMBI, 1999; BAUMAN *et al.* 1999). A partir da quantificação destes ácidos graxos na gordura do leite produzido, pode-se realizar uma estimação indireta do nível de atividade da enzima, em função das taxas de desaturação calculadas com equações propostas por MALAU-ADULI *et al.* (1997); SOL-MORALES *et al.* (2000) e PALMQUIST *et al.* (2004).

Com base neste conjunto de informações, o presente estudo teve por objetivo:

- Avaliar a possível existência de polimorfismos para a região promotora da SCD na espécie ***Bubalus bubalis***.
- Quantificar os teores de ácidos graxos monoinsaturados e poliinsaturados (CLA), verificando assim, a possibilidade de associação entre a produção destes ácidos graxos e os possíveis genótipos da enzima.

MATERIAL E MÉTODOS

3.1. PCR (*Reações em cadeia da DNA polimerase*)

A partir da sequência da região promotora da SCD bubalina, obtida com a técnica GW (GenBank: GQ336861) foram sintetizados 2 oligonucleotídeos para as reações de PCR com as seguintes configurações:

P1► (forward)> 5' - AGT TCT TGC TTC TTC GG –3'

P2◄ (reverse)> 5' - GTT GGA GAC CTA AGT TTG C –3'

Testes preliminares das reações de PCR foram realizados, objetivando-se a adequação das quantidades de reagentes e da temperatura ideal para a amplificação dos fragmentos obtidos com os “primers” P1► ◄P2. Para tanto, foram utilizadas 12 alíquotas de 100ng de DNA genômico retiradas da mesma amostra, escolhida aleatoriamente. As amplificações foram realizadas num volume final de 25 µL /amostra, contendo 100 ng de DNA genômico, 0,5 µM de cada “primer”, tampão PCR 1X, 100 nM de dNTPS, 0,5 U de Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen®). Os ciclos de amplificação foram realizados em termociclador MasterCycler Eppendorff®, submetidos a uma programação com o seguinte gradiente de temperaturas de anelamento:

Tubos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Temp.°C	46,5	47,0	47,5	48,0	48,5	49,0	49,5	50,0	50,5	51,0	51,5	52,0

O programa completo consistiu em uma desnaturação inicial do DNA a 95°C por 5 minutos, 35 ciclos - 95°C por 30 segundos; temperatura do gradiente (tubos de 1 a 12) por 30 segundos; 72°C por 30 segundos - e 72°C por 5 minutos finais.

Na etapa seguinte, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (1,5%), em tampão TBE 1X com brometo de etídeo (0,05 µg/mL) a 80V, por

aproximadamente 50 minutos. A visualização foi feita em luz ultravioleta (UV) e o gel foi fotodocumentado com aparelho Gel-Doc (Bio-Rad®).

As reações de PCR em termociclador de gradiente permitiram a adequação da temperatura de anelamento dos “primers” P1 e P2 em 49,5°C. Com isso, foram realizadas novas reações, no intuito de isolar e amplificar a região promotora da SCD das 214 amostras de DNA genômico previamente extraído.

As amplificações foram realizadas num volume final de 25 µL /amostra, contendo 100 ng de DNA genômico, 0,5 µM de cada “primer”, tampão PCR 1X, 100 µM de dNTPS, 0,5 U de Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen®). As reações de PCR foram realizadas em um termociclador convencional, modelo PTC-100 da **MJ Research**® sob a seguinte programação: desnaturação inicial do DNA a 95°C por 5 minutos, 35 ciclos - 95°C por 30 segundos; 49,5°C por 30 segundos; 72°C por 30 segundos - e 72°C por 5 minutos finais.

3.2. SSCP (Polimorfismo de conformação das cadeias simples de DNA)

Foram analisadas 214 amostras contendo os fragmentos da região promotora da SCD bubalina. Cada amostra, com volume final de 10 µL, continha 4 µL do produto da PCR diluída em 6 µL de Tampão SSCP (95% de formamida, 20mM EDTA, 0,05% de azul de bromofenol, 0,05% de xileno-cianol), de acordo com a metodologia descrita por ORITA *et al.* (1989).

As amostras foram então submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante (Acrilamida:Bis-acrilamida/49:1) à concentração de 12%. Utilizou-se o aparato SequiGen 38x50 cm (BioRad ®). Após eletroforese por 8 horas a 40V, os géis foram mantidos, por aproximadamente 1 hora, em solução contendo 1L de água Milli-Q e 50 µL de brometo de etídio. A visualização das bandas foi feita em luz ultravioleta (UV) e os géis fotodocumentados em aparelho GelLogic (Kodak®).

3.3. Clonagem, sequenciamento e análise das sequências obtidas.

Para a etapa de clonagem, foram realizadas novas reações de PCR de três amostras para cada um dos respectivos padrões de migração obtidos nas análises de PCR-SSCP. Os fragmentos correspondentes a cada genótipo foram clonados em vetor T (p-GEM-T Easy Vector System, Promega®). As reações de ligação dos produtos de PCR aos vetores foram realizadas em um volume final de 10 µL/amostra, composto de 1µL de T4 DNA ligase (3 U/µL), 2 µL de tampão 1X da T4 DNA ligase, 1 µL do pGEM-T (vetor plasmidial) e aproximadamente 200 ng do produto amplificado, para uma reação final de 10 µL. Esta reação permaneceu em termociclador a 4°C por 16 horas.

Após a ligação, os plasmídios (vetores) recombinantes foram inseridos para transformação de células competentes de *Escherichia coli* linhagem DH10β, previamente preparadas no Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada do Departamento de Biologia Aplicada a Agropecuária/ Unesp Jaboticabal. Nesse processo, aos 10 µL do material ligado foram adicionados a 200 µL de células competentes (E. coli-DH10β) em tubo de 1,5 mL estéril posteriormente incubado em gelo por 30 minutos, seguindo-se de incubação em banho-maria por 90 segundos a 42°C, e novamente incubação no gelo por 2 minutos.

Em seguida, as células foram transferidas para tubos Falcon de 15 mL e foram adicionados 800 µL de meio com posterior incubação por 1 hora a 37°C com agitação de 2 x g.

Após esse período, foram feitas culturas destas bactérias, semeando-se 100 µL das células em placa de Petri contendo meio LB sólido suplementado com 50 µL de ampicilina (100.000 µg/mL) por, aproximadamente, 16 horas a 37°C, para posterior seleção de colônias transformadas. Sobre o meio de cultura das placas de Petri espalhou-se, previamente, 70 µL de X-Gal (50 mg/mL).

As colônias de bactérias transformadas e não transformadas foram diferenciadas pelas colorações branca e azul, respectivamente, sendo as colônias brancas então coletadas com palitos estéreis e depositadas em microplacas com 96 poços, contendo 100 µL de meio LB suplementado com 50 µL de ampicilina (100.000 µg/mL). As placas

foram seladas e mantidas na estufa à 37°C por 22 horas. Posteriormente, aos clones foram adicionados 100 µL de glicerol 40% para estocagem dos mesmos em freezer - 80°C. Alíquotas de 10 µL foram retiradas das culturas permanentes e adicionadas a 1 mL de meio LB líquido com 50 µL de ampicilina em novas microplacas de 96 poços, seguindo de incubação a 37°C por 16 horas com agitação de 6 x g. Essas culturas foram utilizadas na minipreparação de DNA plasmidial pelo método de lise alcalina (SAMBROOK & RUSSELL, 2001).

Após a extração do DNA plasmidial, foi feita a confirmação da inserção dos fragmentos nos vetores. Em uma reação de digestão, 8µL do DNA plasmidial extraído foram misturados a 2µL de tampão 10X e 0,5µL da enzima de restrição EcoRI (Invitrogen®). Os produtos da digestão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE 1X com brometo de etídio (0,05 µg/mL) a 75V, por aproximadamente 2 horas. A visualização foi feita em luz ultravioleta (UV) e o gel foi fotodocumentado em aparelho GelLogic (Kodak®)

Foram selecionadas 3 amostras (repetições) para cada genótipo, totalizando 18 amostras a serem sequenciadas - 9 no sentido forward (P1) e 9 no sentido reverse (P2). As análises de seqüenciamento destas amostras, a partir das extremidades 5' e 3', foram realizadas pelo Serviço de sequenciamento de DNA do Centro de Estudos do Genoma Humano (CEGH), ligado ao Instituto de Biociências da USP. As leituras foram realizadas no aparelho MegaBACE 1000 Automated Sequencer (GE Healthcare), um sistema de análise de DNA de 96 capilares. As reações de sequenciamento foram realizadas de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante, utilizando o DYEnamic ET Dye Terminator Kit (com Thermo Sequenase™ II DNA Polimerase). As sequências foram obtidas com auxílio do software Sequence Analyser utilizando o Base Caller Cimarron Version 3.12.

Para simples confirmação de resultados, as sequências nucleotídicas obtidas foram submetidas à consulta de similaridade de nucleotídeos com a sequência de número GQ336861 depositada no GenBank, em acesso ao endereço eletrônico www.ncbi.nlm.nih.gov do NCBI (National Center for Biotechnology Information). A ferramenta utilizada para esta consulta foi o BLASTn – Basic Local Alignment Search

Tools, disponível neste mesmo endereço. As análises de edição envolvendo o pareamento dos dados, montagem de sequências contíguas e caracterização das sequências nucleotídicas, foram realizadas utilizando ferramentas disponíveis nos “softwares”: CodonCode Aligner® **trial-version1.4.6**; CLC Free Workbench 4; CAP3; BioEdit e CONSED.

3.4. Quantificação dos ácidos graxos da gordura do leite bubalino

Durante os anos de 2003 e 2004 foram coletadas mensalmente (10 meses), amostras de 50 mL do leite produzido na ordenha da manhã por 48 búfalas da raça Murrah pertencentes ao rebanho da Fazenda Santa Eliza – Dourado/SP. As amostras eram devidamente identificadas e congeladas para posterior extração de gordura. Os animais eram mantidos sob regime de pastejo, em áreas cultivadas de ***Brachiaria decumbens***. Após serem ordenhadas, as búfalas recebiam uma ração totalmente misturada (TMR), composta por silagem de sorgo, resíduos de cervejaria e farelo de soja.

Para as extração da gordura do leite, as amostras eram descongeladas e centrifugadas a 8°C, por 30 minutos, sob 10414 x g. Em seguida, pesou-se 40 mg de gordura, e adicionou-se solução de hexano-isopropanol, de acordo com metodologia descrita por HARA & RADIM (1978). Para a metilação dos ácidos graxos, seguiu-se a metodologia descrita por CHRISTIE (1982), e adaptada por CHOUINARD **et al.** (1999) empregando-se solução básica de metóxido de sódio.

A quantificação dos ácidos graxos do leite foi realizada por cromatografia gasosa em equipamento Trace GC 3 pertencente Laboratório de Nutrição e Crescimento Animal da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ/USP-Piracicaba, aparelhado com detector de chama (FID), coluna capilar SUPELCO 2-4056 SPTM – 2560, de 100 m x 0,25 mm de diâmetro, e espessura do filme 0,2 µm. O gás de arraste utilizado foi o hidrogênio, com fluxo de 40 mL/minuto. A temperatura inicial da rampa foi 70°C por 4 minutos, em seguida a temperatura foi elevada a 13°C/minuto até atingir 175°C, permanecendo por 27 minutos nesta temperatura (1^a rampa); depois a

temperatura foi aumentada a 4°C/minuto até atingir 215°C, permanecendo por 11 minutos nesta temperatura (2ª rampa); a 3ª rampa foi alcançada aumentando-se a temperatura a 4°C/minuto até atingir 240°C, permanecendo por 4 minutos, sendo a temperatura máxima 250°C. O tempo de corrida de cada amostra foi de 70 minutos, com injeção de 1µL/amostra.

3.4. Análises estatísticas

As frequências gênicas (x_i e x_j) para os alelos da SCD (i e j) e genotípicas obtidas com a PCR-SSCP (x_{ii} , x_{ij} e x_{jj}) foram determinadas a partir da contagem direta dos genótipos observados e estabelecidas com as seguintes equações:

$$x_i = \frac{n_{ii} + (0,5n_{ij})}{n} \qquad x_j = \frac{n_{jj} + (0,5n_{ij})}{n}$$

$$x_{ii} = \frac{n_{ii}}{n} \qquad x_{ij} = \frac{n_{ij}}{n} \qquad x_{jj} = \frac{n_{jj}}{n}$$

Onde: n_{ii} , n_{jj} e n_{ij} correspondem ao número de homozigotos e heterozigotos observados nos alelos i e j , respectivamente; n corresponde ao número de indivíduos analisados.

Para testar a aderência das frequências observadas ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, foi utilizado o software estatístico GENEPOP versão 3.1 (RAYMOND & ROUSSET, 1995). As frequências genotípicas esperadas, em equilíbrio, foram estimadas a partir da expansão do binômio descrito por FALCONER & MCKAY, (1996):

$$(x_i + x_j)^2 = x_i^2 + 2x_i x_j + x_j^2$$

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 .

O conjunto de dados foi submetido a uma série de análises exploratórias, com o intuito de diagnosticar a sua consistência. Os 54 animais considerados nas análises de associação possuíam frequências genótípicas com valores idênticos aos observados nos 214 animais previamente genotipados com a PCR-SSCP. As idades ao parto das búfalas foram distribuídas em classes (CI), onde: classe 1 = idade ao parto menor que 1080 dias, classe 2 = idade ao parto entre 1080 e 1410 dias, classe 3 = idade ao parto entre 1410 e 1770 dias, classe 4 = idade ao parto entre 1770 e 2130 dias e classe 5 = idade ao parto maior que 2130 dias.

Os meses de lactação, também foram distribuídos em classes (CML) para melhor ajuste dos dados, onde: CML 1 = meses 1 e 2; CML 2 = mês 3; CML 3 = mês 4; CML 5 = mês 6; CML 6 = mês 7; CML 7 = mês 8 e CML 8 = meses 9 e 10. Também considerou-se, nas análises, os efeitos fixos da época do parto, sendo: ep 1 = período das águas e ep 2 = período das secas. Foram quantificadas as produções dos seguintes ácidos graxos: C14:0; **cis**-9,C14:1; C16:0; **cis**-9,C16:1; C18:0; **cis**-9,C18:1; **trans**-11,C18:1 e **cis**-9,**trans**-11CLA.

A atividade da enzima SCD, foi estimada em função das taxas de dessaturação calculadas com as seguintes equações, propostas por MALAU-ADULI **et al.** (1997); SOL-MORALES **et al.** (2000) e PALMQUIST **et al.** (2004):

$$1 \rightarrow 14 : 1 / 14 = \text{cis} - 9, C14 : 1 / (C14 : 0 + \text{cis} - 9, C14 : 1)$$

$$2 \rightarrow 16:1/16 = \text{cis}-9, C16:1 / (C16:0 + \text{cis}-9, C16:1)$$

$$3 \rightarrow 18:1/18 = \text{cis}-9, C18:1 / (C18:0 + \text{cis}-9, C18:1)$$

$$4 \rightarrow \text{CLA} / \text{trans}-11, C18:1 = \text{cis}-9, \text{trans}-11, \text{CLA} / (\text{trans}-11, C18 + \text{cis}-9, \text{trans}-11, \text{CLA})$$

$$5 \rightarrow ID = \frac{(\text{cis}-9, C14:1 + \text{cis}-9, C16:1 + \text{cis}-9, C18:1 + \text{cis}-9, \text{trans}-11, \text{CLA})}{C14:0 + \text{cis}-9, C14:1 + C16:0 + \text{cis}-9, C16:1 + C18:0 + \text{cis}-9, C18:1 + \text{cis}-9, \text{trans}-11, \text{CLA}}$$

Onde:

equação 1 = Taxa de dessaturação do ácido mirístico em ácido miristoléico;

equação 2 = Taxa de dessaturação do ácido palmítico em ácido palmitoléico;

equação 3 = Taxa de dessaturação do ácido esteárico em ácido oléico;

equação 4 = Taxa de dessaturação do ácido vacênico em ácido linoléico conjugado;

equação 5 = Índice de Dessaturação geral;

As medidas de produção dos ácidos graxos foram avaliadas em um modelo de efeitos fixos, aplicando-se uma análise de medidas repetidas no tempo. Para tanto, foi utilizado o procedimento MIXED do SAS (2000) com a opção repeated. Como medida repetida, considerou-se o mês de controle. Os dados foram analisados com o seguinte modelo linear:

$$y_{ijklmno} = \mu_i + AP_j + gSCD_k + CI_l + CML_m + EP_n + Touro_o + \varepsilon_{ijklmno}$$

Onde: $y_{ijklmno}$ = variável dependente (produção de ácidos graxos e equações 1, 2, 3, 4, 5); μ_i = média geral para o $i^{\text{ésimo}}$ ácido graxo e $i^{\text{ésima}}$ equação (1, 2, 3, 4, 5); AP_j = efeito fixo do $j^{\text{ésimo}}$ ano de parto (2003, 2004); $gSCD_k$ = efeito fixo do $k^{\text{ésimo}}$ genótipo (AA, AB, BB); CI_l = efeito fixo da $l^{\text{ésima}}$ classe de idade ao parto (1, 2, 3, 4, 5); CML_m = efeito fixo da $m^{\text{ésima}}$ classe do mês de lactação (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8); EP_n = efeito fixo da $n^{\text{ésima}}$ época de parto (águas, secas); $Touro_o$ = efeito aleatório do $o^{\text{ésimo}}$ touro; $\varepsilon_{ijklmno}$ = erro aleatório residual.

Foram estudados diferentes arranjos para modelar o resíduo, considerando diferentes estruturas de (co)variâncias para cada uma das características. As estruturas AR(1): autoregressiva de primeira ordem; ARMA(1,1): autoregressiva de primeira ordem com média móvel; CS: simétrica composta; TOEP: Toeplitz; TOEP(2): Toeplitz com duas bandas; VC: componentes de variância considerando homogeneidade de

variâncias, enquanto as estruturas ARH(1): autoregressiva heterogênea de primeira ordem; CSH: simétrica composta heterogênea; FA(1): fator analítico de primeira ordem; HF: HuynhFeldt; TOEPH: Toeplitz heterogênea; UN: não estruturada com heterogeneidade. Na estrutura CS, todas as covariâncias são iguais e, na VC, as covariâncias são nulas. As demais estruturas consideram diferentes covariâncias para cada par de medidas.

Para escolha da estrutura de (co)variância dos resíduos mais adequada foram utilizados os critérios de informação de Akaike (AIC) e Bayesiano de Schwarz (BIC) (WOLFINGER, 1993). Os testes de AIC e BIC permitem uma comparação entre os modelos não aninhados e penalizam aqueles com maior número de parâmetros, sendo que o BIC atribui uma penalidade mais rigorosa.

Os critérios de informação foram calculados como:

$$AIC = -2\log L + 2p$$

$$BIC = -2\log L + p\log(n - r)$$

Em que: p = número de parâmetros do modelo; N = número total de observações; r = posto da matriz de incidência dos efeitos fixos no modelo; $\log L$ = logaritmo da função de máxima verossimilhança restrita (WOLFINGER, 1993). Menores valores para AIC e BIC indicam melhor ajuste. As médias de ácidos graxos para os diferentes genótipos foram comparadas utilizando-se o teste de Tukey ($p < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os testes preliminares de PCR, em termociclador com gradiente de temperaturas, permitiram a otimização da temperatura de anelamento dos “primers” P1► ◀P2 em 49,5°C, conforme mostra a Figura 11.

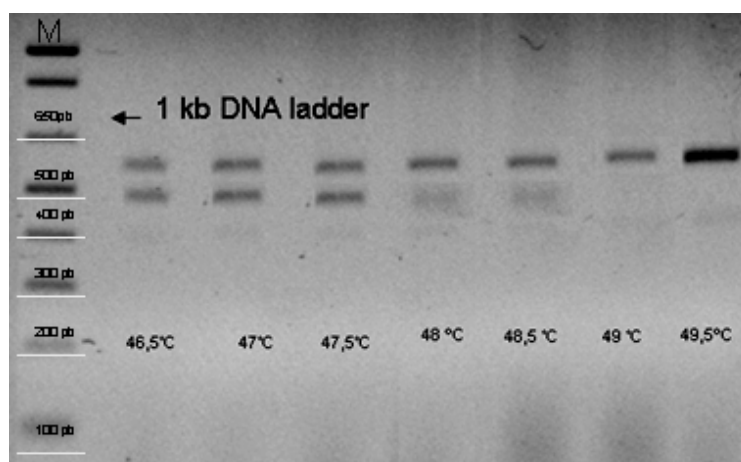


Figura 11. Foto representativa dos produtos obtidos nas reações preliminares de PCR, com o respectivo gradiente de temperaturas. M= marcador de peso molecular; gel de agarose a 1,5%.

Após esta adequação da temperatura de anelamento, as amostras dos 214 animais tiveram a região promotora do gene da SCD bubalina isolada e amplificada. As reações de PCR com “primers” P1► ◀P2 geraram fragmentos de 588 pb, conforme mostra a Figura 12.

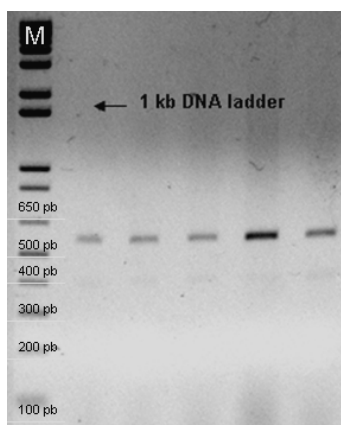


Figura 12. Foto representativa dos fragmentos de 588 pb obtidos nas reações de PCR. M= marcador de peso molecular; gel de agarose a 1,5%.

A aplicação da PCR-SSCP, permitiu a identificação de polimorfismos no grupo de 214 animais estudados. Conforme ilustrado na Figura 13, os resultados mostraram três padrões de migração distintos entre as bandas de DNA, denominados como AA, AB e BB, respectivamente. Reações de contraprova (repetições) foram realizadas para todas as amostras e os padrões de migração se mantiveram, evidenciando a detecção do polimorfismo.

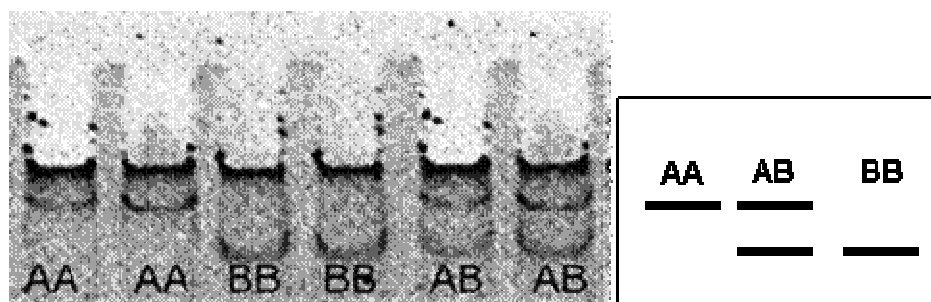


Figura 13. Foto e eletroferograma representativos dos 3 diferentes padrões de migração obtidos pela aplicação da técnica de DNA-SSCP na região promotora do gene da SCD bubalina; Gel de poliacrilamida a 12%.

A análise das sequências obtidas, após a clonagem das amostras correspondentes aos genótipos identificados com a PCR-SSCP, permitiram a caracterização completa dos alelos A e B para a região estudada. A confirmação de que estas sequências correspondiam à região promotora da SCD bubalina, foi proporcionada com submissão destas ao BLASTn, obtendo-se similaridade de 99% com a sequência GQ336861.

O alinhamento comparativo da variante B em relação à variante A, possibilitou a identificação de polimorfismos pontuais (SNPs) que determinaram a variação nos padrões de migração obtidos com a PCR-SSCP. Conforme ilustrado na Figura 14, estes polimorfismos foram caracterizados por uma deleção na posição 296 (citosina na

variante A) representadas nas imagens 1 e 2, respectivamente, e dois **loci** heterozigotos representados pelas imagens 3 (posição 324) e 4 (posição 409). Comparando-se a variante B em relação à variante A, ocorreram substituições de citosinas por adeninas nas posições 324 e 409.

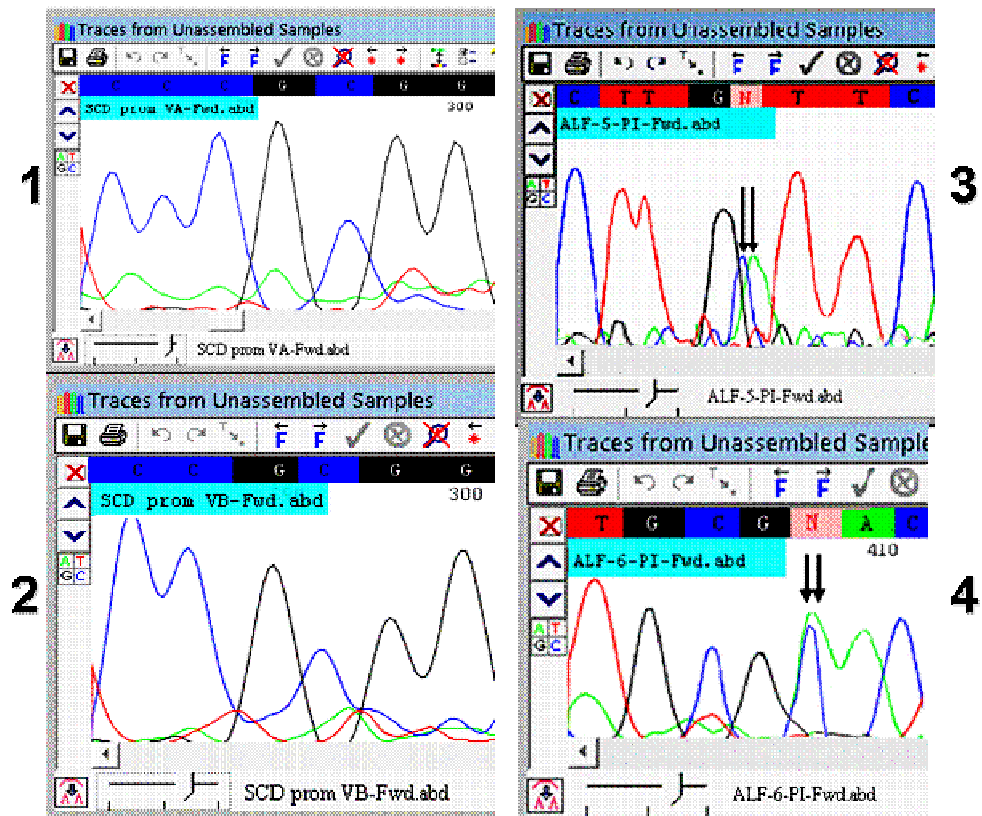


Figura 14. Cromatogramas representativos dos polimorfismos identificados após reações de clonagem e sequenciamento. 1 e 2 = deleção de uma citosina na posição 296 da variante B; Imagem 3 = genótipo heterozigoto, setas marcam a posição 324; 4 = genótipo heterozigoto, setas marcam a posição 409; as linhas nas cores azul, vermelha, verde e preta, correspondem aos nucleotídeos C, T, A e G, respectivamente.

Autores como TANIGUCHI *et al.* (2004) e KEATING *et al.* (2006), avaliaram a sequência de nucleotídeos da região promotora da SCD em bovinos das raças Wagyu, Frísio Holandês, Montbeliarde, Normândia, Norueguês Vermelho, Frísio Irlandês, Frísio Alemão, Charolês e Limousin, respectivamente (Números de acesso no GenBank: AB106355 e AJ555480.2). Entretanto, estes autores não identificaram a presença de polimorfismos na região 5' acima do sítio de início de transcrição. As análises de similaridade entre as sequências obtidas neste estudo e as sequências descritas para a espécie bovina, mostraram homologia de 94% entre os nucleotídeos que as compõem.

As frequências alélicas e genotípicas, observadas para a região promotora do gene da SCD bubalina, estão descritas na Tabela 3.

Tabela 3 Frequências gênicas e genotípicas da região promotora da SCD obtidas com PCR-SSCP. Os valores entre parênteses correspondem ao número observado de animais para cada genótipo identificado.

N	Frequências alélicas		Frequências genotípicas		
	A	B	AA (77)	AB (113)	BB (24)
214	0,62	0,38	0,36	0,53	0,11

Os valores esperados para as frequências dos genótipos AA, AB e BB foram iguais a 0.38, 0.47 e 0.14, respectivamente. As frequências observadas aderem ao teorema de Hardy-Weinberg quando comparadas com as esperadas pelo teste do χ^2 ao nível de significância de 5%, pois o valor de $\chi_{obs}^2 < \chi_c^2$. Este resultado indica que a região promotora da SCD está em equilíbrio, na amostra populacional de 214 búfalas da raça Murrah avaliada neste estudo. A possível explicação para o equilíbrio de H - W na região estudada pode ser devido ao pressuposto que não houve seleção para os teores de ácidos graxos produzidos pelos animais.

Os efeitos fixos do ano de parto afetaram significativamente ($p < 0.05$) os teores dos ácidos graxos mirístico (C14:0), oléico (*cis*-9, C18:1), vacênico (*trans*-11, C18:1) e *cis*-9, *trans*-11CLA. Estes resultados podem ser atribuídos a diferentes condições ambientais ocorridas no ano de 2003 em relação a 2004, que podem ter influenciado favoravelmente a produção dos respectivos ácidos graxos.

A época do parto afetou a produção do ácido vacênico ($p < 0.05$), sendo que, os animais que pariram na época das águas apresentaram maiores produções em relação àqueles que pariram nas secas. De acordo com KAY *et al.* (2005) este resultado pode ter sido influenciado pelo fato das búfalas terem parido após passarem pela estação das secas, ocasionando um ganho compensatório após o parto que favorece não só a produção de gordura, mas também um aumento no aporte deste ácido graxo à glândula mamária via síntese *de novo*.

Os meses de lactação afetaram significativamente, ao nível de 5% de probabilidade, todos os ácidos graxos avaliados neste estudo. Isto pode ser explicado pela correlação existente entre os ácidos graxos considerados nas análises e a produção de gordura no leite, ao longo da lactação (BAUMAN, 2001). Na Tabela 4, pode-se observar como as médias destes ácidos graxos ficaram distribuídas nas classes de lactação. Os maiores teores de ácidos graxos ocorreram em estágios mais tardios da lactação o que pode ser atribuído à correlação negativa existente entre os teores de gordura e as quantidades de leite produzidos nestes estágios.

Tabela 4. Médias dos quadrados mínimos de ácidos graxos produzidos no leite de búfalas (g / 100g de gordura) nas diferentes classes de lactação.

CLASSES DO MÊS DE LACTAÇÃO																							
1			2			3			4			5			6			7			8		
ÁCIDO GRAXO	Média	EP	Média	EP	Média	EP	Média	EP	Média	EP	Média	EP	Média	EP	Média	EP	Média	EP	Média	EP	Média	EP	
C14:0*	7,61 (BC)	0.20	7,62 (B)	0.20	7,62 (B)	0.20	7,65 (B)	0.20	8,21 (A)	0.20	7,83 (B)	0.20	29,31 (A)	0.32	7,62 (B)	0.19	7,40 (C)	0.20	28,37 (B)	0.31	7,40 (C)	0.20	
C16:0*	28,08 (B)	0.52	29,05 (A)	0,45	28,67 (B)	0.35	28,72 (B)	0.33	29,33 (A)	0.30	29,31 (A)	0.30	29,31 (A)	0.32	28,78 (AB)	0.31	28,37 (B)	0.31	28,37 (B)	0.31	28,37 (B)	0.31	
C18:0*	18,38 (A)	0.59	17,86 (A)	0.67	17,87 (A)	0.55	17,21 (A)	0.55	15,35 (B)	0.52	15,36 (B)	0.52	15,36 (B)	0.52	15,84 (B)	0.48	15,72 (B)	0.51	15,72 (B)	0.48	15,72 (B)	0.51	
trans-11 C18:1*	2,36 (B)	0.12	2,50 (B)	0.13	2,87 (A)	0.11	2,58 (B)	0.11	2,45 (B)	0.10	2,35 (BC)	0.10	2,35 (BC)	0.10	2,20 (C)	0.09	2,03 (C)	0.10	2,03 (C)	0.09	2,03 (C)	0.10	
cis-9 C14:1*	0,27 (C)	0.03	0,31 (BC)	0.02	0,29 (C)	0.01	0,37 (B)	0.03	0,43 (AB)	0.02	0,46 (A)	0.03	0,46 (A)	0.03	0,46 (A)	0.02	0,44 (A)	0.02	0,44 (A)	0.02	0,44 (A)	0.02	
cis-9 C16:1*	1,35 (C)	0.08	1,44 (B)	0.05	1,41 (B)	0.05	1,52 (B)	0.08	1,65 (A)	0.07	1,76 (A)	0.08	1,76 (A)	0.08	1,79 (A)	0.07	1,80 (A)	0.08	1,80 (A)	0.07	1,80 (A)	0.08	
cis-9 C18:1*	21,19 (CD)	0.58	20,35 (D)	0.60	20,73 (D)	0.50	21,20 (C)	0.56	21,46 (C)	0.51	22,21 (C)	0.55	22,21 (C)	0.55	23,20 (B)	0.53	24,29 (A)	0.57	24,29 (A)	0.53	24,29 (A)	0.57	
cis9,trans11CLA*	0,51 (B)	0.04	0,56 (B)	0.03	0,65 (A)	0.02	0,59 (AB)	0.04	0,67 (A)	0.03	0,67 (A)	0.03	0,67 (A)	0.03	0,60 (A)	0.03	0,64 (A)	0.04	0,64 (A)	0.03	0,64 (A)	0.04	

EP = erro padrão da média.

* corresponde ao efeito significativo da classe de lactação sobre o ácido graxo considerado no modelo (p < 0.05).

A,B,C letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatisticamente significantes (p < 0.05), pelo teste de Tukey-Kramer.

De acordo com KAY *et al.*(2005), esta variação ao longo da lactação pode ocorrer também, devido à mobilização das reservas de gordura corporal das vacas nos estágios finais da lactação.

Conforme disposto na Tabela 5, os genótipos avaliados para a região promotora do gene da SCD afetaram significativamente as produções dos ácidos graxos: mirístico (C14:0), oléico (*cis*-9, C16:1) e miristoléico (*cis*-9, C18:1).

Tabela 5. Médias dos quadrados mínimos de ácidos graxos produzidos no leite de búfalas (g / 100g de gordura) em função dos genótipos da SCD obtidos.

ÁCIDO GRAXO	GENÓTIPO SCD					
	AA		AB		BB	
	Média	EP	Média	EP	Média	EP
C14:0*	8.10 ^(A)	0.16	7.91 ^(AB)	0.20	7.22 ^(B)	0.37
C16:0	29.04	0.24	28.68	0.30	28.65	0.51
C18:0	16.20	0.39	16.80	0.33	16.42	0.35
<i>trans</i> -11 C18:1	2.43	0.06	2.38	0.08	2.44	0.14
<i>cis</i> -9 C14:1*	0.40 ^(A)	0.01	0.38 ^(AB)	0.02	0.37 ^(B)	0.03
<i>cis</i> -9 C16:1	1.58	0.05	1.54	0.06	1.66	0.09
<i>cis</i> -9 C18:1*	21.65 ^(B)	0.45	21.49 ^(AB)	0.50	22.34 ^(A)	0.63
<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 CLA	0.61	0.01	0.61	0.02	0.62	0.03

EP = erro padrão da média.

* corresponde ao efeito significativo do genótipo sobre o ácido graxo considerado no modelo ($p < 0.05$).

^{A,B} letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$), pelo teste de Tukey-Kramer.

Estes resultado foram semelhantes aos obtidos por MELE *et al.* (2007) e MOIOLI *et al.* (2007), que avaliaram o efeito de genótipos descritos para o exon 5 do gene da SCD, sobre a produção de ácidos graxos na gordura do leite produzido por vacas das raças bovinas Holandesa, Jersey, Piemontesa e Valdostana, em rebanhos italianos. Talvez, esta semelhança de resultados entre polimorfismos na região promotora e na região codificadora permitam testar a hipótese, em estudos futuros, da possível existência de correlações genéticas epistática entre as duas regiões, na expressão do gene da SCD.

Não foram observados efeitos significativos dos genótipos da região promotora da SCD bubalina e os teores de CLA produzidos no leite. Entretanto, houve uma

associação do genótipo AA, a quantidades 8% maiores do **cis**-9, **trans**-11 CLA, em relação ao genótipo BB ($p=0.37$). Talvez, esta diferença não tenha sido estatisticamente significativa, devido ao tamanho reduzido da população amostrada.

Um resultado atrativo obtido nas análises realizadas foi o efeito de 4% dos touros avaliados no modelo, sobre a variância para o isômero **cis**-9, **trans**-11 CLA, o que indica um efeito genético aditivo nas variações do CLA, produzidas no leite de búfalas.

As análises indiretas de atividade dessaturativa da SCD, estão descritas na Tabela 6.

ÁCIDO GRAXO	GENÓTIPO SCD					
	AA		AB		BB	
	Média	EP	Média	EP	Média	EP
14:1/14 *	4.60 ^(A)	0.01	4.30 ^(AB)	0.02	4.10 ^(B)	0.02
16:1/16	1.63	0.05	1.59	0.06	1.71	0.09
18:1/18	23.15	0.38	23.12	0.45	24.06	0.69
CLA/ trans -11 C18:1	0.91	0.03	0.89	0.03	0.84	0.04
ID	30.28	0.48	30.44	0.56	31.27	0.90

Tabela 6. Médias dos quadrados mínimos das taxas de dessaturação de ácidos graxos produzidos no leite de búfalas (g / 100g de gordura) em função dos genótipos da SCD obtidos.

EP = erro padrão da média.

* corresponde ao efeito significativo do genótipo sobre a taxa de dessaturação considerada no modelo ($p<0.05$).

^{A,B} letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$), pelo teste de Tukey-Kramer.

Os resultados obtidos indicam o efeito significativo dos genótipos sobre as taxas de dessaturação do ácido graxo mirístico em ácido graxo miristoléico. De acordo com LOCK & GARNSWORTHY, (2003) e FIEVEZ *et al.*, (2003) esta taxa de dessaturação é a que melhor afere a atividade da SCD, pois o leite possui quantidades muito maiores de cis-9,C14:1, comparado com apenas elementos traços deste isômero no fluido ruminal.

Esta variação nas taxas dessaturativas aa relação 14:1/14, indicaram que pode existir influência dos genótipos para explicar parte da variabilidade existente. Do ponto de vista prático, isto permitiria, a partir de investigações futuras, o desenvolvimento de

programas de seleção assistida direcionados para a mudança do perfil de ácidos graxos na gordura do leite bubalino, de forma favorável a nutrição humana, pelo aumento no consumo de alimentos ricos em ácidos graxos mono e poliinsaturado.

Embora não tenham sido observados efeitos significativos dos polimorfismos sobre as médias das dessaturações de ácido vacênico em ácido linoléico conjugado (CLA/**trans**-11 C18:1), estes resultados devem ser interpretados com cautela, pois o número de indivíduos avaliados neste estudo foi relativamente baixo para inferências definitivas. Outros fatores também devem ser investigados, considerando-se a existência de variações individuais inerentes à síntese de CLA pela SCD na glândula mamária, como por exemplo: a existência de polimorfismos na região codificadora do gene; o conhecimento mais aprofundado dos possíveis mecanismos pós-transcricionais e pós-traducionais que também poderiam influenciar a expressão e a atividade da SCD.

Os resultados obtidos no presente estudo permitem inferir que as técnicas utilizadas permitiram a identificação de alelos polimórficos na região promotora da enzima SCD em *Bubalus bubalis*, bem como a associação destes polimorfismos com os teores quantificados de ácidos graxos na gordura do leite de búfalas. A sequência de nucleotídeos da variante B, com os **loci** polimórficos descritos pela primeira vez nesta espécie, foi depositada no GenBank e encontra-se disponível pelo número de acesso GQ336862.

CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados obtidos no presente estudo permitem as seguintes inferências:

- Foi possível realizar a completa caracterização da região promotora do gene da enzima ***Estearoil Coenzima A dessaturase***, na espécie ***Bubalus bubalis***;
- A técnica de análise molecular DNA-SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism), mostrou-se bastante eficiente na detecção de polimorfismos genéticos nesta região;
- As associações dos genótipos obtidos com o isômero ***cis-9***, ***trans-11***CLA não foram significativas, entretanto foi verificada associação com outros ácidos graxos passíveis de dessaturação pela SCD;

REFERÊNCIAS*

BAUMAN, D. E., L. H. BAUMGARD, B. A. CORL, GRIINARI J. M.. Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants.In: **Proc. Am. Soc. Anim. Sci.** 1999. Disponível em <http://www.asas.org/jas/symposia/proceedings/0937.pdf>.

BAUMAN, D.E., The role of $\Delta 9$ -desaturase in the production of *cis-9*, *trans-11* CLA. **Journal of Nutritional Biochemistry** v.12, p. 622–630, 2001.

* ABNT, 2002

BOBE G., BEITZ D. C., FREEMAN A. E., LINDBERG G. Texture of butter from cows with different milk fatty acid composition . **J.Dairy Sci.** v.86, p.3122-3127, 2003.

CESANO A., VISSONNEAU S., SCIMECA J.A., KRITCHEVSKY D., SANTOLI D. Opposite effects of linoleic acid and conjugated linoleic acid on human prostate cancer in SCID mice. **Anticancer Res** v.18, p.1429–1434, 1998.

CHILLIARD, Y., FERLAY, A., MANSBRIDGE, R.M., DOREAU, M., Ruminant milk fat plasticity: nutritional control of saturated, polyunsaturated, trans and conjugated fatty acids. **Ann. Zootech.** v.49, p.181–205, 2000.

CHOUINARD, P.Y.; CORNEAU, L.; BARBANO, D. M. Conjugated linoleic acids alter milk fatty acid composition and inhibit milk fat secretion in dairy cows. **Journal of Nutrition**, v.129, n. 8, p.1579-1584, 1999.

CHRISTIE, W, W. A simple procedure for rapid transmethylation of glycerolipids and cholesterol ester. **Journal of Lipid Research**, v. 23, p. 1072. 1982.

CONTE G., MELE M., CASTIGLIONI B., SERRA A., VIVA M., CHESSA S., PAGNACCO G., SECCHIARI P. Relationship between bovine SCD polymorphism locus and mammary gland desaturation activity. In: **Proceedings of the 8th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production**, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 13–18 August, p. 22–37, 2006.

FALCONER, D.S.; MACKAY, T.F.C. Introduction to quantitative genetics. 4.ed. **Longman Press**, London, UK, 1996.

FIEVEZ V.; VLAEMINCK, B.; DHANOA, M. S. **et al.** Use of principal components analysis to investigate the origin of heptadecenoic acid and conjugated linoleic acids in milk. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p 1017-1053, 2003.

GRIINARI, J. M., CORL, B. A., LACY, S. H. , CHOUINARD, P. Y., NURMELA, K. V. V., BAUMAN, D. E. Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating cows by $\Delta 9$ -desaturase. **J. Nutr.** v.130, p.2285-2291, 2000.

HARA, A.; RADIM, N. S. Lipid extraction of tissues with low toxicity solvent. **Analytical Biochemistry**, v. 90, p. 420-426, 1978.

HAYASHI K. PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. **Genome Res.** v.1, p.34-38, 1991.

HAYWARD, M.D.; McADAM, N.J.; JONES, J.G.; EVANS, C.; EVANS, G.M.; FORSTER, J.W.; USTIN, A.; HOSSAIN, K.G.; QUADER, B.; STAMMERS, M.; WILL, J.K. Genetic markers and the selection of quantitative traits in forage grasses. **Euphytica**, v.77, p.269-75, 1994.

IP C., BRIGGS S.P., HAEGELE A.D., THOMPSON H.J., STORKSON J., **et al.** The efficacy of conjugated linoleic acid in mammary cancer prevention is independent of the level or type of fat in the diet. **Carcinogenesis** v.17, p.1045–1050, 1996.

KARIJORD O., STANDAL N., SYRSTAD O. Sources of variation in composition of milk fat. **Z.Tierzucht.** v.99, p81-93, 1982.

KAY, K., W. J. WEBER, C. E. MOORE, D. E. BAUMAN, L. B. HANSEN, H. CHESTER-JONES, B. A. CROOKER, AND L. H. BAUMGARD. Effects of week of lactation and genetic selection for milk yield on milk fatty acids composition in Holstein cows. **J. Dairy Sci.** v.88, p.3886–3893, 2005.

KEATING A.F., KENNELLY J.J., ZHAO F.Q. Characterization and regulation of the bovine stearoyl-CoA desaturase gene promoter. **Biochem Biophys Res Commun.** v.344, n.1, p.233-40, 2006.

LIEW C., SCHUT H.A.J., CHIN S.F., PARIZA M.W., DASHWOOD R.H. Protection of conjugated linoleic acids against 2-amino-3-methylimidazol [4,5-f] quinoline-induced colon carcinogenesis in the f344 ra—a study of inhibitory mechanisms. **Carcinogenesis** v. 16, p.3037–3043, 1995.

LITTELL, R.C.; HENRY, P.R.; AMMERMAN, C.B. Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. **Journal of Animal Science**, v.76, n.4, p.1216-1231, 1998.

LOCK, A. L.; GARNSWORTHY, P. C. Seasonal variation in milk conjugated linoleic acid and Δ^9 -desaturase activity in dairy cows. **Livestock Production Science**, v.79, p. 47-59, 2003.

MALAU-ADULI, A. E. O., B. D. SIEBERT, C. D. K. BOTTEMA, AND W. S. PITCHFORD. A comparison of the fatty acids composition of triacylglycerols in adipose tissue from Limousin and Jersey cattle. **Aust. J. Agric. Res.** v.48, p.715–722, 1997.

MELE M., CONTE G., CASTIGLIONI B., CHESSA S., MACCIOTTA N. P. P., SERRA A., BUCCIONI A., PAGNACCO G., SECCHIARI P. Stearoyl-Coenzyme A Desaturase Gene Polymorphism and Milk Fatty Acid Composition in Italian Holsteins. **J. Dairy Sci.** v.90, p.4458–4465, 2007

MILLER A., STANTON C., **et al.** Modulation of arachidonic acid distribution by conjugated linoleic acid isomers and linoleic acid in MCF-7 and SW480 cancer cells. **Lipids** v.36, p.1161-1168, 2001.

MOIOLI B., CONTARINI G., AVALLI A., CATILLO G. **et al.** Effect of Stearoyl Coenzyme A desaturase polymorphism on fatty acid composition of Milk. **J.Dairy Sci** v.90, p.3553-3558, 2007.

NTAMBI, J. M.. Regulation of stearyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol. **J. Lipid Res.** v.40, p.1549–1558, 1999.

ORITA M.H., IWAHANA H., HANAZAMA K., SEKIYA, T. Detection of polymorphism of human DNA by gel electrophoresis as single strand conformation polymorphism. **Proc Natl Acad Sci** v.86, n.8, p. 2766-2770, 1989.

PALMQUIST, D. L., ST-PIERRE, N., MCCLURE, K. E. Tissue fatty acid profiles can be used to quantify endogenous rumenic acid synthesis in lambs. **J. Nutr.** v.134, p.2407–2414, 2004.

PALOMBO J. D., GANGULY A. J., BISTRIAN B. R., **et al.** The antiproliferative effects of biologically active isomers of conjugated linoleic acid on human colorectal and prostatic cancer cells. **Cancer Lett** v.177, 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 Res.** v.20, 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. **J. Dairy Sci.** v.85, p.2164-2172, 2002.

RAYMOND M., ROUSSET F. GENEPOP (version 1.2): A population genetics software for exact tests and ecumenism. **J. Hered.**, v.86, p.248-249, 1995.

SAMBROOK J., RUSSELL D. Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3.ed. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, New York, NY,USA, 2001.

SAS. STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM - SAS. User's guide . Version 8. 2.ed. Cary (CD-ROM), 2000.

SOL-MORALES, M., D. L. PALMQUIST, AND W. P. WEISS. Effect of fat source and copper on unsaturation of blood and milk triacylglycerol fatty acids in Holstein and Jersey cows. **J. Dairy Sci.** v.83, p.2105–2111, 2000.

SOYEURT, H., P. DARDENNE, A. GILLON, C. CROCQUET, S. VANDERICK, P. MAYERES, C. BERTOZZI, AND N. GENGLER. Variation in fatty acid contents of milk and fat within and across breeds. **J. Dairy Sci.** v.89, p.4858–4865, 2006.

SUNNUCKS P., WILSON A.C.C., BEHEREGARAY L.B., ZENGER K., FRENCH J., TAYLOR A.C. SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. **Molecular Ecology**, v.9, p.1699 – 1710, 2000.

TANIGUCHI M., UTSUGI T., OYAMA K.,MANNEN H. **et al.** Genotype of Stearoyl CoA desaturase is associated with fatty acid composition in Japanese Black cattle. **Mamm. Genome** v.14, p.142-148, 2004

TANIGUCHI, M., T. UTSUGI, K. OYAMA, H. MANNEN, M. KOBAYASHI, Y. TANABE, A. OGINO, AND S. TSUJI. Genotype of stearoyl-CoA desaturase is associated with fatty acids composition in Japanese Black cattle. **Mamm. Genome** v.14, p.142–148, 2003.

TELENTI A., IMBODEN P., MARCHESI F., SCHMIDHEINI T., BODMER T. Direct, automated detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by Polymerase

Chain Reaction and Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.37, n.10, p. 2054-2058, 1993.

VISONNEAU S., CESANO A., TEPPER S.A., SCIMECA J.A., SANTOLI D., **et al.** Conjugated linoleic acid suppresses the growth of human breast adenocarcinoma cells in SCID mice. **Anticancer Res** v.17, p.969–974, 1997.

WOLFINGER, R. Covariance structure selection in general mixed models. **Communications in Statistics**, v.22, n.4, p.1079-1106, 1993.

APÊNDICE

SOLUÇÕES

A. TE-TWEEN

6,05g → Trisma Base

0,37g → EDTA

5 mL → Tween 20

QSP 100ml → Água Milli-q autoclavada

B. PCI (fenol-clorofórmio-álcool isoamílico)

Fenol ultrapuro (bidestilado), saturado com tampão Tris 100mM pH 8.0

Clorofórmio

Álcool isoamílico (IAA)

Misturados na proporção 25:24:1, pH 7.3, para volume de 250 mL.

C. TEB

108g → Trisma base

55g → Ácido Bórico

40mL → EDTA 0,5 M (pH 8,0)

O volume foi acertado para 1000mL com água destilada, deionizada e filtrada em filtro Milli-Q (água Milli-Q). o tampão foi autoclavado e mantido a 4°C. No momento do uso, o mesmo foi diluído com água Milli-Q para a obtenção da concentração desejada.(1X).

D. TE (10/1, pH 7,5)

10mL → TRIS-HCl 1M pH 7,5

2mL → EDTA 0,5M pH 8,0

O volume foi completado para 1000 mL com água bidestilada e a solução autoclavada.

E. Tampão PCR 1X (10 mM Tris-HCl pH 9,0; e)

TRIS HCl 0,5 M pH 9,0

1,5 mM MgCl_2

50 mM KCl

Diluiu-se a solução de TRIS-HCl 1M pH 9,0 em água bidestilada na proporção de 1:1. Misturando-se em os sais de Potássio e Magnésio

F. Tampão SSCP

950uL → Formamida Deionizada

40uL → EDTA 0,5M pH 8,0

0,25mg/mL → Azul de Bromofenol

0,25mg/mL → Xileno-Cianol

G. Solução hexano-isopropanol,

Solução volume/volume na proporção 3:2

H. Solução básica de metóxido de sódio

(Quantidades / amostra metilada)

2 mL → hexano

40 μL → metil acetato.

40 μL → solução de metilação

1,75 mL de metanol

0,4 mL de 5,4 mol/L de metóxido de sódio

60 μL → solução reagente de terminação

1 g ácido oxálico

30 ml dietil éter

200 mg → cloreto de cálcio

MEIOS DE CULTURA

A. SOC

128,4 μ L $\rightarrow$ KCl 2M
100 μ L $\rightarrow$ MgSO₄ 1M
100 μ L $\rightarrow$ Mg Cl₂ 1M
200 μ L $\rightarrow$ de glicose 1M
10 mL $\rightarrow$ meio LB liquido 2X

B. LB sólido

2g $\rightarrow$ Triptona
1g $\rightarrow$ Extrato de Levedura
1g $\rightarrow$ NaCl
1,5g $\rightarrow$ Agar
QSP $\rightarrow$ água Mili-Q completar o volume de 100 mL

C. LB líquido

2g $\rightarrow$ Triptona
1g $\rightarrow$ Extrato de Levedura
1g $\rightarrow$ NaCl
QSP $\rightarrow$ água Mili-Q completar o volume de 100 mL