

CIRCULAR TÉCNICA

63

Concórdia, SC
Dezembro, 2022

Otimização de protocolos de detecção molecular por PCR e qPCR para diagnóstico do gene do halotano em suínos

Adriana Mércia Guaratini Ibelli
Jane de Oliveira Peixoto
Elsio Antonio Pereira de Figueiredo
Mônica Corrêa Ledur



Otimização de protocolos de detecção molecular por PCR e qPCR para diagnóstico do gene do halotano em suínos¹

A hipertermia maligna é uma doença muscular hereditária e latente, caracterizada por uma síndrome hipermetabólica em resposta à exposição aos anestésicos voláteis em humanos (Rosenberg et al., 2015). Em suínos, essa condição é conhecida como síndrome do estresse dos suínos (PSS - *Porcine Stress Syndrome*) e foi descrita por Topel et al. (1968), que notou que alguns animais sofriam colapso e morriam após um desafio estressante. Vários fatores, como estresse físico, calórico, castração, briga entre animais, vacinação e inclusive a administração do anestésico halotano podem desencadear a morte de suínos afetados (Stalder, 2012). Por isso, o gene responsável por essa desordem passou a ser chamado de gene do halotano (HAL). Os sintomas incluem tremores musculares, dificuldade e irregularidade na respiração, alterações na cor da pele, aumento da temperatura corpórea, colapso e rigidez muscular, o que causa danos no fígado e nos rins e também danos neurológicos e morte (Christian; Lunstrom, 1992).

A síndrome do estresse do suíno é herdada recessivamente, ou seja, apenas animais com o genótipo duplo homozigoto recessivo podem ser afetados, sendo que os efeitos não são exatamente os mesmos em todos os animais (Christian; Lunstrom, 1992; O'Brien et al., 1993). Fujii et al. (1991) descobriram uma mutação causal no gene do receptor de rianodina 1 (*ryr1*), que está localizado no cromossomo 6 dos suínos, na posição p11 - q21. Esta mutação é do tipo SNP (nucleotídeo de base única) e está localizada na posição 1843 do gene, onde se identifica a troca de uma citosina (que resulta no alelo normal N) no DNA por outra base, a timina (que resulta no alelo deletério n). Assim, os genótipos para o gene do halotano são comumente chamados de NN para os animais normais que apresentam as bases CC (Citosina-

¹ Adriana Mércia Guaratini Ibelli, Bióloga, doutora em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, analista da Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC. Jane de Oliveira Peixoto, Zootecnista, doutora em Zootecnia, pesquisadora da Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC. Elsie Antonio Pereira de Figueiredo, Zootecnista, doutor em Melhoramento Genético Animal, pesquisador da Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC. Mônica Corrêa Ledur, Zootecnista, doutora em Genética e Melhoramento Animal, pesquisadora da Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC.

Citosina), Nn para o heterozigoto (portador) que apresentam as bases CT (Citosina-Timina) e nn para os animais afetados que apresentam as bases TT (Timina-Timina). A mudança de nucleotídeos acarreta uma alteração de aminoácido na posição 615 de uma arginina para uma cisteína (Fujii et al., 1991). Tal mutação causa falha no canal receptor de rianodina liberador de Ca^{++} do retículo sarcoplasmático, resultando na liberação do Ca^{++} duas vezes mais rápido do que em animais normais. As altas concentrações de Ca^{++} aumentam o estímulo da contração muscular, utilização de glicogênio e ácido láctico e, conseqüentemente, o aparecimento de carne PSE (pálida, mole e exudativa) (Fujii et al., 1991).

As perdas na produção de suínos relacionadas à hipertermia maligna se dão devido aos danos neurológicos, no fígado e rins, pelo aparecimento da carne PSE e até mesmo pela morte súbita de animais. O monitoramento dos animais para a presença desse alelo deletério (n) é de suma importância, pois auxilia tanto na escolha de animais reprodutores como nos cuidados de manejo de animais suscetíveis, diminuindo os gastos e perdas na produção. Dessa maneira, apesar do amplo monitoramento para se evitar o aparecimento da síndrome do estresse do suíno nas últimas décadas, ainda se verifica a presença do alelo deletério em diversas raças. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi otimizar um teste de diagnóstico utilizando a metodologia clássica de PCR-RFLP (polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição) e também desenvolver um teste molecular utilizando PCR em tempo real (qPCR) como alternativa mais rápida para o diagnóstico do gene do halotano em suínos.

Para isso, a extração do DNA a partir de tecido da orelha foi realizada em 106 amostras de suínos da raça Pietrain, usando o PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen) e seguindo as instruções do fabricante. Após, um teste de PCR-RFLP foi padronizado como alternativa à técnica HAL1843TM (licenciada por Innovations Foundation, Toronto, Canadá), desenvolvida por Fujii et al. (1991). Para isso, um par de primers específicos para o gene *ryr1* foi desenhado usando o primer-blast software (Ye et al., 2012): HAL2_F (CTCACAGCCCCCTGCGTCTC) e HAL2_R (GCCAGGGACAAGCTGGGACA), para amplificação de um fragmento de 505 pb do gene alvo.

As condições da PCR para volume final de 30 µL foram:

- tampão de reação 1X;
- 1,66 mM de cloreto de magnésio (MgCl₂);
- 0,2 µM de cada primer;
- 1,5 U de Taq DNA polimerase Platinum (Invitrogen);
- 75 ng de DNA.

As condições de termociclador foram:

- desnaturação inicial de 94 °C por 5 minutos;
- seguidos de 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos;
- 61 °C por 30 segundos;
- 68 °C por 1 minuto
- com extensão final de 68 °C durante 5 minutos.

Para confirmar os resultados da amplificação e a especificidade do fragmento obtido, foi realizada a eletroforese em gel de agarose a 2%. Para a genotipagem dos animais foi realizada a análise de RFLP. A reação de PCR-RFLP foi realizada para um volume final de 10 µL, usando 1 unidade (U) da enzima de restrição HhaI, 1X tampão de reação da enzima e 2 µL do produto amplificado na PCR. A reação foi incubada a temperatura de 37 °C por 2 horas e após foi aplicada em gel de agarose 2% com brometo de etídio (0,5 µg/mL) usando 3 V/cm de voltagem por 2 horas. O gel de agarose foi analisado em transluminador UV onde foram observadas as bandas para o genótipo normal (262 e 242 pb), heterozigoto (505, 262 e 242 pb) e afetado (505 pb).

Em uma segunda fase, foi realizado o ensaio de discriminação alélica usando PCR em tempo real (qPCR). Para isso, foram utilizados um par de *primers* e duas sondas marcadas com fluorescência, uma para o alelo N (normal) e outra para o alelo n (mutado), que foram customizados utilizando-se o software da Applied Biosystems. As sequências de *primers* foram:

- Hal_direto (CCCTGTGTGTGTGCAATGG)
- Hal_Reverso (CAGGGAGCAAGTTCTCAGTAATGA)

As sondas foram:

- Hal_C (5'VIC-TTGGTTGGAGCGCACG-MGB-3')
- Hal_T (5'-FAM-TTGGTTGGAGCACACG-MGB-3).

As reações de qPCR foram realizadas em equipamento de PCR em tempo real 7500 SDS (Applied Biosystems), usando 1X TaqMan Genotyping Master Mix (Applied Biosystems), 0,75 µL do mix de primers e sondas 20X (Custom TaqMan SNP Genotyping Assays), 25 ng de DNA e água para completar os 15 µL do volume final da reação. As condições de termociclagem foram:

- 50°C por 2 minutos
- 95°C por 3 minutos
- seguidos de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos
- 60°C por 1 minuto.

A discriminação alélica foi realizada com o Software 7500 SDS v2.0.5 (Applied Biosystems). Para verificar a especificidade do teste, todas as 106 amostras de DNA foram genotipadas pelos dois métodos e os resultados foram comparados. Nenhuma das amostras falhou nas análises e os três genótipos possíveis, NN (normal), Nn (heterozigoto) e nn (afetado) foram observados nas amostras avaliadas (Figura 1). Considerando todos os animais genotipados, 39 foram homozigotos para o alelo normal (NN), 57 foram heterozigotos (Nn) e 10 foram homozigotos para o alelo susceptível (nn). Observou-se na linhagem amostrada uma frequência relativamente alta do alelo deletério (36,32%). Quando se comparou a genotipagem obtida nas duas técnicas, os resultados foram concordantes para todas as amostras, indicando a alta especificidade de ambos os ensaios. Na Figura 1B é possível observar os 3 genótipos separados de acordo com as diferenças nos níveis de fluorescência adquirida na reação de amplificação em tempo real.

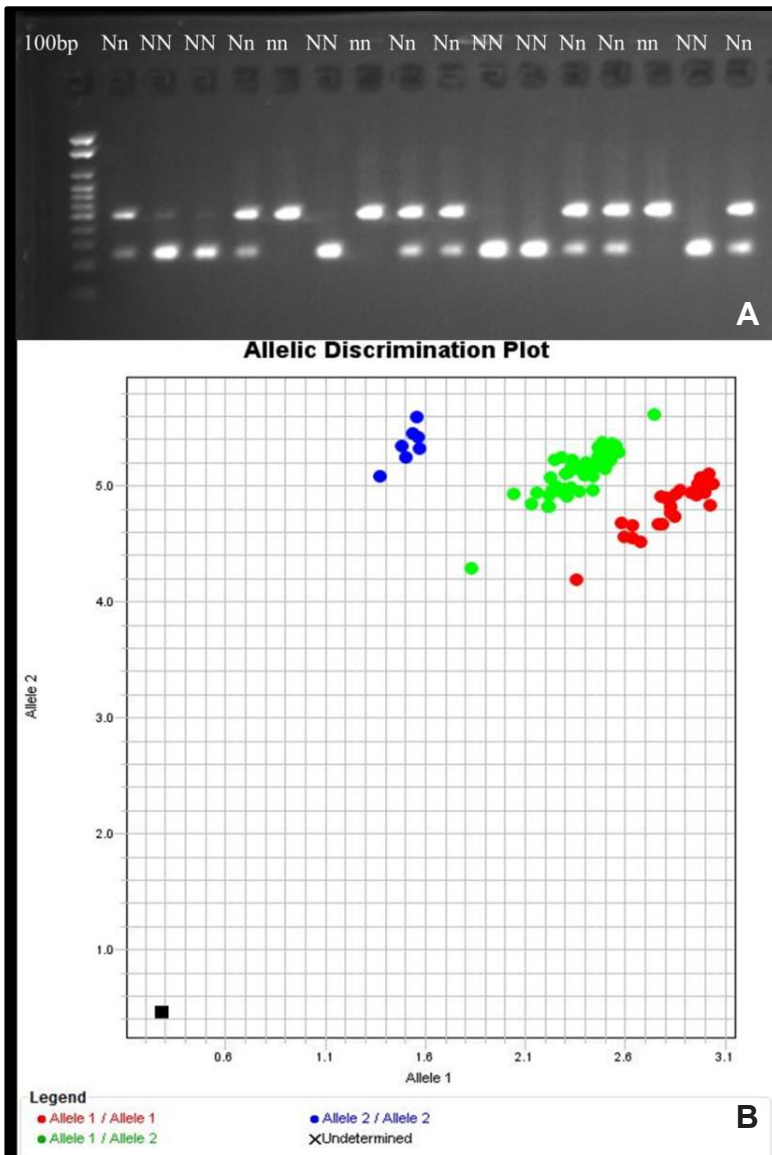


Figura 1. (A) Genotipagem usando PCR-RFLP: NN - genótipo normal (262 e 242 bp), Nn - heterozigoto (505, 262 e 242 bp) e nn - afetado (505 bp); e (B) genotipagem usando sondas Taqman-MGB: Vermelho (homozigotos para alelo normal), verde (heterozigotos) e azul (homozigotos para o alelo deletério).

A hipertermia maligna é uma condição bem conhecida na suinocultura, especialmente pelas perdas causadas (O'Brien et al., 1993). Os produtores e a indústria têm desenvolvido estratégias para prevenir esse problema nas últimas décadas, eliminando o alelo recessivo de seus planteis devido a maior incidência de carne PSE e menor rendimento de carne processada em animais portadores, o que seria uma fonte de perda econômica para o setor de carne, além da mortalidade no pré-abate. Contudo, alguns produtores mantêm animais heterozigotos por apresentarem melhor eficiência alimentar, maiores rendimentos de carcaça e maior conteúdo de carne magra em relação aos demais genótipos (Fávero; Bellaver, 2007). Isso dificulta o controle do alelo deletério, o qual é mantido em baixa frequência nas populações. Assim, dois testes específicos foram desenvolvidos e estão disponíveis para a detecção do gene do halotano, sendo que houve 100% de concordância entre as genotipagens obtidas nos dois testes. Além disso, conclui-se que o uso de sondas Taqman-MGB e real-time PCR pode substituir a técnica de PCR-RFLP no diagnóstico do gene do Halotano em suínos, apresentando a mesma eficiência da tecnologia mais antiga e realizada em menor período de tempo.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Embrapa pelo apoio financeiro e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (Capes) - Código de Financiamento 001. AMGI e MCL são bolsistas de Produtividade em Pesquisa do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq.

Referências

CHRISTIAN, L. L.; LUNSTRÖM, K. Porcine stress syndrome. In: **Diseases of swine**, 7th, ed. Iowa: State University Press, Ames, IA., 1992. p. 763-771.

FÁVERO, J. A.; BELLAYER, C. Produção de carnes de suínos. Concórdia, 2007. Disponível em: http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc_arquivos/palestras_q7t2f5k.pdf. Acesso em: 10 ago. 2022.

FUJII, J.; OTSU, K.; ZORZATO, F.; DE LEON, S.; KHANNA, V. K.; WEILER, J. E. Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science*, v. 253, p. 448-451, 1991.

YE, J.; COULOURIS, G.; ZARETSKAYA, I.; CUTCUTACHE, I.; ROZEN, S.; MADDEN, T. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. **BMC Bioinformatics**, v. 13, article number 134, 2012. DOI:10.1186/1471-2105-13-134.

O'BRIEN, P. J.; SHEN, H.; CORY, C. R.; ZHANG, X. Use of a DNA-based test for the mutation associated with porcine stress syndrome (malignant hyperthermia) in 10,000 breeding swine. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 203, n. 6, p. 842-851, 1993.

ROSENBERG, H.; POLLOCK, N.; SCHIEMANN, A.; BULGER, T.; STOWELL, K. Malignant hyperthermia: a review. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 10, p. 93, 2015.

TOPEL, D. G.; BICKNELL, E. J.; PRESTON, K. S.; CHRISTIAN, L. L.; MATSUSHIMA, C. Y. Porcine stress syndrome. **Modern Veterinary Practice**, v. 49, p. 40-60, 1968.

USDA-FSIS interview reports. In: Pork Chain Quality Audit. National Pork Producers Council publication. Des Moines, IA 50306, 1994.

Exemplares desta edição
podem ser adquiridos na:

Embrapa Suínos e Aves
Rodovia BR 153 - KM 110
Caixa Postal 321
89.715-899, Concórdia, SC
Fone: (49) 3441 0400
Fax: (49) 3441 0497
www.embrapa.br

www.embrapa.br/fale-conosco/sac

1ª edição

Versão eletrônica (2022)



MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



Comitê Local de Publicações
da Embrapa Suínos e Aves

Presidente

Franco Muller Martins

Secretária-Executiva

Tânia Maria Biavatti Celant

Membros

Clarissa Silveira Luiz Vaz, Cláudia Antunez Arrieche, Gerson Neudi Scheuermann, Jane de Oliveira Peixoto, Rodrigo da Silveira Nicoloso e Sara Pimentel

Supervisão editorial

Tânia Maria Biavatti Celant

Revisão técnica

Fernando de Castro Tavernari

Raquel Rebelatto

Revisão de texto

Jean Carlos Porto Vilas Boas Souza

Normalização bibliográfica

Claudia Antunez Arrieche

Projeto gráfico da coleção

Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica

Vivian Fracasso

Fotos da capa

Adriana Mercia Guaratini Ibelli e Jairo Backes