

Utilização da técnica de PCR-RFLP (reação em cadeia de polimerase-polimorfismo do comprimento de restrição) no estudo de uma região do gene da *Stearoyl-coa-desaturase* em vacas holandesas. Renan Baraldi Thomazine, Humberto Tonhati, Gregório Miguel Ferreira de Camargo, Livia Boarini, André Luís Ferreira Lima, Antonio Roberto Otaviano. Agrárias – Zootecnia – Departamento de Zootecnia - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Campus de Jaboticabal.

O leite e seus derivados são considerados alimentos funcionais, pois, além de serem fontes de energia, proteínas de alta qualidade e variedade em vitaminas e minerais, alguns estudos mostraram a contribuição destes na prevenção e tratamento de algumas doenças. O consumo de alimentos que contenham Ácidos Linolêicos Conjugados (CLA), proporciona efeitos benéficos na prevenção e tratamento de várias doenças, dentre elas, o câncer. A principal fonte de CLA disponível para o consumo humano está presente na gordura do leite e de produtos lácteos derivados de ruminantes. A maior parte do CLA (*cis*-9, *trans*-11/C18:2) presente no leite destes animais é sintetizada na glândula mamária, por ação da enzima *Stearoyl-CoA-Desaturase* (SCD), (KAY *et al.* 2002, GRIINARI *et al.* 2000, ENOCH *et al.* 1976). Considerando possíveis variações genéticas entre animais, quanto à capacidade de sintetizar CLA, e que, algumas destas variações ocorrem devido a diferenças nos níveis de SCD nos tecidos da glândula mamária (CHILLIARD *et al.* 2000), o objetivo do presente estudo foi fazer uso de marcadores moleculares para identificar a possível existência de polimorfismos na região estudada do gene da SCD, verificando suas variações e a influência exercida na via endógena da síntese do CLA em vacas holandesas.

Os animais avaliados neste trabalho foram 60 fêmeas da raça holandesa, foram colhidos 5 mL de sangue de cada vaca por venopunção da veia jugular, utilizando-se tubos *vacutainer* B&D® contendo 7,5 mg de EDTA. Os tubos foram identificados com a numeração de cada animal e mantidos a 4° C. O DNA genômico foi extraído da fase leucocitária, conforme metodologia descrita por ZADWORNÝ & KUHNLEIN (1990). A amplificação do fragmento do gene da *Stearoyl CoA Desaturase* (SCD), foi realizada num volume final de 25 mL contendo 100 ng de DNA, 0,5 mM de cada iniciador (Z-5' - CAGCACAGCAGGTCGGGTC - 3') e (D1-5' - CCATGAGGATGATGTTTCTCC - 3'), 1X PCR Tampão [10 mM Tris-HCl (pH 9,0), 1,5 mM MgCl₂ e 50 mM KCl], 100 mM de dNTPs e 0,5 U de Taq polimerase. Os ciclos de amplificação seguiram a programação em termociclador PTC-100 MJ, da seguinte forma: 95 °C por 1 minuto, seguido de 30 ciclos (95 °C, 1 minuto; 56 °C, 1 minuto; 72 °C, 1 minuto). Após a amplificação do fragmento do gene, o mesmo foi submetido à digestão por enzimas de restrição num volume de 20 mL (*Hinf* I - 10 mL da reação, 2 mL de Tampão da enzima, 0,2 mL da enzima, 7,8 de H₂O) e levadas ao termociclador para digestão a 37° C por 1 hora. Após a digestão, os fragmentos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (3,5%), em tampão TBE 1X (Tris-HCl 89 mM; EDTA 2,5 mM e Ácido Bórico 89 mM e pH 8,3) com brometo de etídio (0,05 m/mL) a 60V, por aproximadamente 2,5 hora. A visualização das bandas foi feita em luz ultravioleta (UV) e o gel foi fotodocumentado em aparelho Gel-Logic (Kodak).

A extração do DNA permitiu obter amostras com excelente qualidade, sendo que, nas reações de PCR o par de iniciadores amplificou perfeitamente um fragmento de 938 pb (pares de bases), dentro do gene estudado (FIGURA 1).

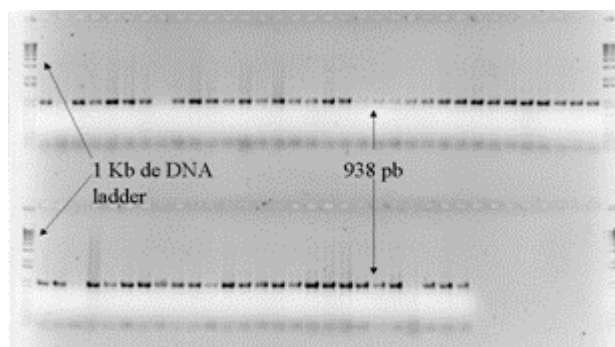


FIGURA 1 - Eletroforograma (gel de agarose a 1,5%) representativo da amplificação do par Z - D1 pela técnica de PCR.

A reação de digestão com a enzima *Hinf I* na região estudada do gene da *Stearoyl CoA Desaturase* (SCD), gerou fragmentos de 530 pb, 277 pb, 131 pb (FIGURA 2). O resultado caracterizou, para as 60 vacas holandesas avaliadas neste estudo, um monomorfismo genético para os sítios de restrição da referida enzima nesta região do gene da SCD.

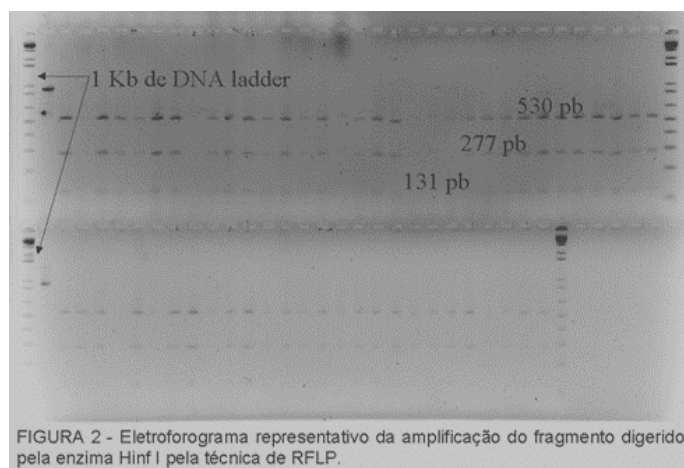


FIGURA 2 - Eletroforograma representativo da amplificação do fragmento digerido pela enzima *Hinf I* pela técnica de RFLP.

Referências Bibliográficas

- CHILLIARD, Y.; FERLAY, A.; MANSBRIDGE, R.M. et al. Ruminant milk fat plasticity: nutritional control of saturated, polyunsaturated, *trans* and conjugated fatty acids. **Annales de Zootechnie**, v.49, p.181-205, 2000.
- ENOCH, H.G., CATALA, A., STRITTMATTER, P. et al. Mechanism of rat liver microsomal stearyl-CoA desaturase. Studies of the substrate specificity, enzyme-substrate interactions, and the function of lipid, **Journal of Biological Chemistry**, v.251, p.5095-5103, 1976.
- GRIINARI, J. M., CORL, B. A., LACY, S. H., et al. Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating cows by Δ^9 -desaturase. **Journal of Nutrition**, Savoy, v.130, p.2285-2291, 2000.
- KAY, J. K., MACKLE, T. R., AULDIST, M. J., et al. 2002. Endogenous synthesis of cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid in pasture-fed dairy cows. **Journal of Dairy Science**, 85(Suppl. 1), 176. (Abstr.), 2002.
- ZADWORNÝ, D.; KUHLEIN, U. – The identification of the kappa-casein genotype in Holstein dairy cattle using the polymerase chain reaction. **Theoretical and Applied Genetic**, v.80, p.631-634, 1990.

Bolsa: Fapesp

