



48ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia

O Desenvolvimento da Produção Animal e a Responsabilidade Frente a Novos Desafios

Belém – PA, 18 a 21 de Julho de 2011



Frequências de variantes alélicas dos genes LGB, OPN, BLAD, DGAT1, CVM e DUMPS¹

Milla Albuquerque de Souza², Marcos Vinicius Gualberto Barbosa da Silva³, Claudio Napolis Costa³, Dênia Borges Attílio², Fábio Pértille², Luiz Lehmann Coutinho⁴

¹Parte do projeto de Iniciação Científica financiado pelo CNPq

²Mestrando(a) do programa Ciência Animal e Pastagens Esalq/USP. e-mail: millapple@gmail.com

³Pesquisador Embrapa Gado de Leite, e-mail: marcos@cnpq.embrapa.br, mmartins@cnpq.embrapa.br

⁴Departamento de Zootecnia - Esalq/USP. e-mail: llcoutho@usp.br

Resumo: O marcador molecular DGAT1 (K232A) foi identificado no gene DGAT1 (diacilglicerol O-aciltransferase 1). No OPN (Osteopontina) foi demonstrado polimorfismo no íntron 4. O gene LGB (beta-lactoglobulina) encontra-se no BTA11. A DUMPS (Deficiência de Uridina Monofosfato Sintetase) é caracterizada por uma mutação no códon 405 do gene UMPS (Uridina Monofosfato Sintetase). O CVM (Complexo de Má Formação Vertebral Cervical) é causado por uma mutação no loco SLC35A3. O BLAD (Deficiência de Adesão Leucocitária Bovina) é causado por uma mutação no gene CD18. Para os genes LGB, OPN, BLAD, DGAT1 e DUMPS, a identificação dos animais portadores pode ser feita por meio da técnica de PCR-RFLP (Reação em cadeia de polimerase – Polimorfismo de fragmento de restrição), para o CVM utilizou-se a técnica de AS-PCR (alelo específico). Por meio dessa técnica foram genotipados 23 touros pertencentes ao teste de progênie da raça Holandesa. A frequência dos alelos K, T e A foi 84,8%; 58,7% e 56,8% para DGAT1, OPN e LGB, respectivamente. Já a frequência dos animais portadores foi 50%; 0,22% e 47,8% para DUMPS, CVM e BLAD, respectivamente. Os resultados permitiram concluir que, para DGAT1, OPN e CVM a população se encontra em equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), o que não ocorre para DUMPS, LGB e BLAD.

Palavras-chave: gene candidato BLAD, gene candidato DGAT1, PCR-RFLP, raça Holandesa

Abstract: The molecular marker DGAT1 (K232A) was identified in DGAT1 gene. In OPN (Osteopontin) was found a polymorphism in intron 4. The LGB gene (beta-lactoglobulin) is on BTA11. DUMPS (Deficiency of Uridine Monophosphate Synthase) is characterized by a mutation at codon 405 of umps gene (Uridine monophosphate synthetase). The CVM is caused by a mutation in SLC35A3 locus. The BLAD is caused by a mutation in the CD18 gene. The identification of carrier animals can be done by PCR-RFLP for the LGB, OPN, BLAD, DUMPS and DGAT1 genes, for the CVM gene was used the AS-PCR technique. Through this technique were genotyped 23 bulls belonging to the progeny test in Holstein. Alleles frequency K, T e A were 84,8%; 58.7% and 56.8% for DGAT1, OPN and LGB, respectively. Already the frequency of carriers was 50%; 0,22% and 47.8% for DUMPS, BLAD and CVM, respectively. The results showed that the population is Hardy-Weinberg equilibrium for DGAT1, OPN, and CVM, which does not occur for DUMPS, LGB and BLAD.

Keywords: BLAD candidate gene, DGAT1 candidate gene, Holstein breed, PCR-RFLP

Introdução

O DGAT1 codifica uma proteína importante na formação dos triglicerídeos. Neste gene foi identificado um marcador molecular, o DGAT1 K232A, o qual está associado à maior porcentagem de gordura no leite (KAUPE et al., 2007).

A OPN é uma glicoproteína altamente fosforilada expressa em vários tecidos. Em estudos com animais da raça Holandesa demonstrou-se que um polimorfismo no íntron 4 do gene OPN foi associado ao aumento nos percentuais de proteína e de gordura no leite (KHATIB et al., 2007).

A LGB representa aproximadamente 55% das proteínas do soro de leite de ruminantes. Esse gene está no cromossomo 11 (BTA11) de bovinos, associado a produção de leite (MEDRANO et al., 1990).

A DUMPS é uma desordem monogênica recessiva autossomal que se origina da mutação não senso (citosina por timina) no códon 405 do gene da (UMPS) Uridina monofosfato sintetase. O resultado é a morte precoce embrionária. Heterozigotos são fenotipicamente normais (SCHWENGER et al., 1993).



O CVM é autossômico recessivo, causado por mutação de G para T no nucleotídeo de posição 559 do gene SLC35A3, que altera a sequência de aminoácidos da uridina difosfato-59 N-acetilglucosamina. Homozigotos são abortados, heterozigotos são normais (GHANEM et al., 2008).

BLAD é caracterizada por reduzida expressão de moléculas de adesão em neutrófilos, as β -integrinas (um complexo de CD11/CD18 família de proteínas ligados às glicoproteínas). Caracterizada por uma mutação de A por G no nucleotídeo de posição 383. Doença hereditária comum na raça Holandesa. Animais homozigotos morrem ainda novos, geralmente por pneumonia. Animais heterozigotos (alelo recessivo) apresentam desenvolvimento normal (SHUSTER et al., 1992).

No presente trabalho foi realizada a genotipagem de touros participantes do Programa de Melhoramento da Raça Holandesa para o polimorfismo dos genes LGB, OPN, BLAD, DGAT1, DUMPS e CVM com o objetivo de estimar suas frequências alélicas e genotípicas e verificar se estes se encontram em EHW.

Material e Métodos

Foi realizada a genotipagem de 23 touros pertencentes ao Teste de Progênie da raça Holandesa, coordenado pela Embrapa Gado de Leite e pela Associação Brasileira de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa. Foram coletadas amostras de sangue, sendo o DNA das amostras foi extraído e quantificado.

Os genótipos dos genes LGB, OPN, BLAD, DGAT1 e DUMPS foram estabelecidos pela técnica de PCR-RFLP. Para a amplificação da região de interesse desses genes foram utilizados *primers* já descritos na literatura. O genótipo foi estabelecido após a digestão dos produtos da PCR utilizando-se a enzima de restrição *Taq* I e *Hae* III para o gene CD18, *Hae* III para o gene LGB, *Pst*I para o gene DGAT1 (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Alemanha), *BsR* I (New England Biolabs, Inc.) para o gene OPN e *Ava* I para o gene UMPS. Os animais portadores de BLAD apresentam o padrão de 58/32/26 pb para *Taq* I e 49/30/19/ 9 pb para *Hae* III. Já os animais normais apresentam o padrão de 32/26 para *Taq* I e 49/9 pb para *Hae* III. O LGB obteve padrão para o genótipo AA de 153/109 pb; BB de 109/79/74 pb e para o AB de 153/109/79/74 pb. No caso do OPN, o alelo T obteve padrão de 290 pb e o alelo C de 200/90 pb. Para o gene UMPS foi observado o padrão de bandas de 53/36 pb para animais normais e 89/53/36 pb para os portadores. O genótipo para o CVM foi amplificado com uma reação em cadeia da polimerase alelo específica (AS-PCR). A PCR produz um fragmento de 522pb e foi observado o padrão de bandas de 395pb (GHANEM et al., 2008). Para o gene DGAT1 foi observado o padrão de bandas de 442/103/23 bp para animais normais e 371/103/71/23 bp para os portadores. As frequências gênicas e genotípicas, bem como o teste de probabilidade de EHW foram estimadas pelo programa GENEPOP web version 3.4 (RAYMOND e ROUSSET, 1995). A probabilidade de EHW associado às frequências genotípicas observadas foi testada pelo teste χ^2 (Qui-Quadrado) ($P < 0,05$).

Resultados e Discussão

Na Tabela 1 podem ser observadas as frequências alélicas, genotípicas e o EHW para os genes DGAT1, OPN, LGB, DUMPS, CVM e BLAD na população estudada. No gene DGAT1, a frequência da variante K foi de 84,8% , sendo relacionada à maior produção de queijo. A frequência da variante T foi 58,7%, para o gene OPN, sendo relacionada à maior produção de leite. No caso da LGB, a variante A obteve frequência de 56,8%, relacionada à maior produção de leite. As frequências genotípicas diferem nesta população, mas não se distanciam do número de animais esperado, estando em acordo com o EHW ($P < 0,05$) para DGAT1 e OPN, o que não ocorre para o LGB.

Tabela 1 – Frequências genotípicas, alélicas e probabilidades de Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Gene	Genótipo	Número de animais		Frequência		EHW *
		Observado	Esperado	Genotípica	Alélica	
DGAT1	KK	17	16,4667	0,7391	(K) 0,848	0,8141
	KA	5	6,0667	0,2173		
	AA	1	0,4667	0,0434	(A) 0,152	
OPN	CC	1	3,8000	0,0434	(C) 0,413	5,819
	CT	17	11,4000	0,7391		
	TT	5	7,8000	0,2173	(T) 0,587	
LGB	AA	10	6,9767	0,4761	(A) 0,568	



48ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia

O Desenvolvimento da Produção Animal e a Responsabilidade Frente a Novos Desafios

Belém – PA, 18 a 21 de Julho de 2011



DUMPS	AB	5	11,0465	0,2381		6,9182
	BB	7	3,9767	0,3333	(B) 0,432	
	TD ¹	21	10,7561	1,05	(T) 0,500	14,878
CVM	DP ²	0	5,1220	0	(P) 0,500	
	TV ³	22	22,0000	0,9565	(T) 0,978	0
	CV ⁴	1	1,0000	0,0434	(C) 0,022	
BLAD	TL ⁵	22	11,7333	0,9565	(T) 0,478	13,2797
	BL ⁶	1	6,1333	0,0434	(B) 0,522	

* = $P < (0,05)$, ¹Homozigoto não portador do alelo para DUMPS, ²Heterozigoto para o alelo DUMPS, ³Homozigoto não portador do alelo para CVM, ⁴Heterozigoto para o alelo CVM, ⁵Homozigoto não portador do alelo para BLAD, ⁶Heterozigoto para o Alelo BLAD.

Para o gene DUMPS, as frequências alélicas das variantes T e P foram iguais a 50%. Para o gene BLAD, o portador B foi predominante, 52,2%, estando bem distribuída na população. Considerando que as frequências genotípicas observadas para DUMPS e BLAD foram significativamente diferentes das frequências esperadas, estimadas pelo teste de χ^2 , a população estudada não se encontra em equilíbrio, de acordo com o postulado por Hardy-Weinberg ($P < 0,05$).

No caso do CVM, as frequências alélicas diferiram muito, sendo na variante T foi de 97,8%. As frequências encontradas estão semelhantes às esperadas. Sendo assim, a população se encontra em EHW ($P < 0,05$). Pelo fato de ter sido genotipado pequeno número de animais e por haver tentativa de diminuição da frequência do alelo letal em touros Holandês, o alelo normal está fixando-se na população. Isso faz com que no teste de EHW a população estudada esteja em equilíbrio, indicando que o gene não está sofrendo seleção.

Conclusões

De acordo com os resultados, foi possível concluir que a população estudada encontra-se em EHW para os genes DGAT1, OPN e CVM. Havendo predominância dos alelos K, T e T, respectivamente. Já os genes DUMPS, LGB e BLAD não se encontram em equilíbrio genético, de acordo com o postulado por Hardy-Weinberg.

Literatura citada

GHANEM, M. E.; AKITA, M.; SUZUKI, T.; KASUGA, A.; NISHIBORI, M.; Complex vertebral malformation in Holstein cows in Japan and its inheritance to crossbred F1 generation. **Animal Reproduction Science**, v. 103, p. 348–354. 2008.

KAUPE, B.; BRANDT, H.; PRINZENBERG, E. M.; ERHARDT, G. Joint analysis of the influence of CYP11B1 and DGAT1 genetic variation on milk production, somatic cell score, conformation, reproduction, and productive lifespan in German Holstein cattle. **J Anim Sci**, v. 85, p.11-21. 2007.

KHATIB, H.; ZAITOUN, I.; WIEBLHAUS-FINGER, J.; CHANG, Y. M.; ROSA, G. J. M. The Association of Bovine *PPARGCIA* and *OPN* Genes with Milk Composition in Two Independent Holstein Cattle Populations. **J. Dairy Sci**, v. 90, p. 2966–2970. 2007.

MEDRANO, J. F.; AQUILAR-CORDOVA, G. Polymerase chain reaction amplification of bovine β -lactoglobulin genomic sequences and identification of genetic variants by RFLP analysis. **Animal Biotechnology**, v. 1 p. 73-74, 1990.

SCHWENGER, B.; SCHOBER, S.; SIMON, D. DUMPS Cattle Carry a Point Mutation in the Uridine Monophosphate Synthase Gene. **Genomics**, v.16, p.241-244, 1993.

SHUSTER, D.E.; KEHRLI, M.E.; ACKERMANN JR., M.R. et al. Identification and prevalence of a genetic defect that causes leukocyte adhesion deficiency in Holstein cattle. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.89, p.9225-9229, 1992.