



Determinação das Frequências Alélicas e Genotípicas do Gene Osteopontina em Bovinos da Raça Girolando¹

Felipe Alves de Almeida², Germano Roberto da Silveira Pereira², Isabela Gomes Barreto da Motta³,
Isabella Silvestre Barreto Pinto⁴, Isabela Fonseca⁵, Wagner Antônio Arbex⁶, Marcos Vinícius G. B. Silva⁶,
Marta Fonseca Martins⁶

¹Projeto financiado pela Embrapa e FAPEMIG

²Alunos do curso de graduação de Biomedicina da Universidade Presidente Antônio Carlos/ Juiz de Fora. e-mail:

felipealvesdealmeida@yahoo.com.br; g.biomedico@gmail.com

³Aluna de graduação do curso de Ciências Biológicas – CES-JF /Juiz de Fora. e-mail: mottaigb@hotmail.com

⁴Bolsista de Apoio Técnico à Pesquisa - BAT II - FAPEMIG. e-mail: isabellajf@gmail.com

⁵Doutoranda em Genética e Melhoramento - UFV/Viçosa. Bolsista CNPq. e-mail: isabela_fonseca@yahoo.com.br

⁶Pesquisadores da Embrapa Gado de Leite. e-mail: arbex@cnpq.embrapa.br, marcos@cnpq.embrapa.br,
mmartins@cnpq.embrapa.br

Resumo: A osteopontina (OPN) é uma proteína altamente fosforilada identificada e estudada em diversas espécies. Em bovinos, a expressão do gene *OPN* está relacionada com a síntese das proteínas β -caseína e κ -caseína no leite, bem como no desenvolvimento da glândula mamária. Além disso, um polimorfismo no íntron quatro do gene *OPN* está relacionado à produção de leite, gordura, proteína e com características de crescimento e ganho de peso dos animais. Com base em estudos de associação entre o gene *OPN* e a produção de leite e características de crescimento, foram identificados dois alelos: o alelo C, associado ao aumento da porcentagem de gordura e proteína no leite e o alelo T, associado a um aumento na produção de leite, ao crescimento e ganho de peso dos animais. Neste trabalho foram genotipados 720 animais da raça Girolando participantes do Programa de Melhoramento desta raça, sendo 104 touros e 616 vacas. O DNA dos animais foi extraído e amplificado pela técnica de PCR produzindo um fragmento de 290 pb, o qual foi submetido à digestão com a enzima de restrição *Bsr* I e os produtos foram observados em gel de agarose. As frequências dos genótipos CC, CT e TT na população foram 0,09, 0,44 e 0,47, enquanto as frequências dos alelos C e T foram 0,31 e 0,69, respectivamente, indicando que esta população encontra-se em Equilíbrio de Hardy-Weinberg ($P < 0,01$). Esses resultados sugerem que nesta população não estão ocorrendo mudanças nas frequências alélicas no gene *OPN*.

Palavras-chave: gordura, leite, OPN, proteína

Determination of Allelic and Genotypic Frequencies of the Osteopontin Gene in Cattle Breed Girolando

Abstract: The osteopontin (OPN) is a highly phosphorylated protein identified and studied in several species. In cattle, the expression of *OPN* gene is related to protein synthesis of β -casein and κ -casein in milk and in mammary gland development. In addition, a polymorphism in intron four of the *OPN* gene is related to milk production, fat and protein and with characteristics of growth and weight gain of animals. Based on studies of association between the *OPN* gene and milk production and growth characteristics were identified two alleles: the C allele, associated with increased fat percentage and milk protein and the T allele, associated with an increased production of milk, growth and weight gain of animals. In this study we genotyped 720 animals Girolando Improvement Program participants of this race, including 104 bulls and 616 cows. The animal DNA was extracted and amplified by PCR yielding a 290 bp fragment, which was digested with restriction enzyme *Bsr* I and the products were observed in agarose gel. The frequencies of genotypes CC, CT and TT in the population were 0.09, 0.44 and 0.47, while the frequencies of alleles C and T were 0.31 and 0.69, respectively, indicating that this population is in Hardy-Weinberg Equilibrium ($P < 0.01$). These results suggest that this population are not occurring changes in allele frequencies in *OPN* gene.

Keywords: fat, milk, OPN, protein



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



Introdução

A osteopontina (OPN) é uma proteína altamente fosforilada, composta de 262 aminoácidos e com massa molecular de 66 kDa (Sorensen e Petersen, 1994), identificada e estudada em várias espécies como camundongos e bovinos, estando localizada nos cromossomos 5 e 6, respectivamente (Nemir et al., 2000; Leonard et al., 2005). Estudos com camundongos que expressavam o RNA antisense de OPN, mostraram que esta proteína é fundamental no desenvolvimento da glândula mamária e na lactação. Em bovinos, a expressão do gene *OPN* está relacionada com síntese das proteínas β -caseína e κ -caseína (Nemir et al., 2000) e com o desenvolvimento da glândula mamária (Sorensen e Petersen, 1994).

Foi verificado que um polimorfismo no íntron quatro do gene *OPN* está relacionado com a produção de leite, gordura, proteína e com as características de crescimento e ganho de peso dos animais. Com base em estudos de associação entre o gene *OPN* e a produção de leite e características de crescimento, foram identificados dois alelos: o alelo C, associado ao aumento da porcentagem de gordura e proteína no leite e o alelo T, associado a um aumento na produção de leite, ao crescimento e ganho de peso dos animais (Leonard et al., 2005). Desse modo, o gene *OPN* tornou-se um candidato para ser utilizado no melhoramento genético de bovinos, viabilizando a seleção de características economicamente importantes em gado leiteiro, necessitando ainda ser validado em outras populações (Khatib et al., 2007).

O presente trabalho teve como objetivo estimar as frequências alélicas e genotípicas do gene *OPN* e verificar se o mesmo encontra-se em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (EHW), a partir da genotipagem de touros e vacas da raça girolando, participantes do Programa de Melhoramento da raça.

Material e Métodos

Foi realizada a genotipagem de 720 animais participantes do Programa de Melhoramento da Raça Girolando, coordenado pela Embrapa Gado de Leite e pela Associação Brasileira dos Criadores de Girolando, sendo 104 touros e 616 vacas.

Foram coletadas amostras de sêmen e/ou sangue, sendo o DNA das amostras extraído utilizando-se o *DNasey® Blood & Tissue Kit* (Qiagen, Hilden, Alemanha), seguindo as recomendações do fabricante. A quantificação e a avaliação da qualidade do DNA foram feitas por espectrofotometria (Nanodrop®, Wilmington, DE, EUA). Os genótipos para o gene *OPN* foram estabelecidos pela técnica de PCR-RFLP, utilizando os *primers* já descritos por Leonard et al. (2005) e, as condições da PCR foram otimizadas quanto à concentração dos reagentes e temperatura de anelamento. As reações foram conduzidas no termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

O fragmento de 290 pb produzido na PCR foi submetido à digestão com a enzima de restrição *Bsr* I (New England Biolabs, Inc.) e o padrão de bandas observado em gel de agarose 2,0% corado com brometo de etídio para o estabelecimento dos genótipos. O resultado do processo de digestão possibilitou a distinção entre os alelos C e T, gerando os seguintes padrões: (1) genótipo TT, caracterizado pela presença de uma banda de 290 pb, (2) genótipo CC, o qual apresenta duas bandas, uma com 200 pb e outra com 90 pb e (3) genótipo CT, o qual possuiu três bandas (290, 200 e 90 pb cada). As frequências alélicas e genotípicas, bem como o teste de equilíbrio de *Hardy-Weinberg* foram calculados por meio do programa Popgen 1.32 (Yeh et al., 1997).

A probabilidade de Equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (EWH) associado às frequências genotípicas observadas foi testada pelo teste χ^2 (Qui-Quadrado) ao nível de significância de 1%.

Resultados e Discussão

As frequências genotípicas foram de 0,09; 0,44 e 0,47 para os genótipos CC, CT e TT, respectivamente (Tabela 1), onde as frequências genotípicas observadas e esperadas encontram-se próximas, indicando que esta população encontra-se em Equilíbrio de *Hardy-Weinberg*, não diferindo estatisticamente ao nível de significância de 1%. Contudo, observa-se que os alelos C (0,31) e T (0,69) não estão igualmente distribuídos, apresentando maior frequência o alelo T.



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



Tabela 1- Frequências genotípicas, alélicas e as probabilidades de Equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (EHW).

Genótipo	Número de Animais		Frequência		EHW
	Observado	Esperado	Genotípica	Alélica	
CC	63	67,42	0,09	0,31 (C)	P<0,01
CT	315	306,16	0,44		
TT	342	346,42	0,47	0,69 (T)	

Os resultados encontrados por Mello (2010), para 434 animais da raça girolando, sendo 87 touros e 347 vacas corroboraram os resultados do presente trabalho, onde as frequências genotípicas estão em EHW e o alelo T (0,719) apresentou maior frequência do que o alelo C (0,281). Entretanto, Leonard et al. (2005) em estudo de um rebanho da raça holandesa, relataram que as frequências dos alelos C (0,49) e T (0,51) estão próximas, sendo esses resultados confirmados por Khatib et al. (2007), ao analisarem dois rebanhos diferentes da raça holandesa.

Conclusões

De acordo com os resultados de genotipagem para o alelo C e T do gene *OPN* foi possível concluir que a população estudada de animais da raça Girolando encontra-se em Equilíbrio de *Hardy-Weinberg*, sugerindo que nesta população não estão ocorrendo mudanças nas frequências alélicas no gene *OPN*. Porém, essa situação de equilíbrio encontrada pode ser devido à amostragem, uma vez que só foram avaliados os animais participantes do Programa de Melhoramento da Raça Girolando.

Literatura citada

- LEONARD, S.; KHATIB, H.; SCHUTZKUS, V. et al. Effects of the osteopontin gene variants on milk production traits in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.88, p.4083-4086, 2005.
- KHATIB, H.; ZAITOUN, I.; WIEBELHAUS-FINGER, J. et al. The association of bovine *PRARGC1A* and *OPN* genes with milk composition in two independent Holstein cattle populations. **Journal of Dairy Science**, v.90, p.2966-2970, 2007.
- MELLO, F. **Diversidade genética e associação do gene da osteopontina com a produção de leite em bovinos da raça girolando**. 2010. 80f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Faculdade de Agronomia / Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- NEMIR, M.; BHATTACHARYA, D.; LI, X. et al. Targeted inhibition of osteopontin expression in the mammary gland causes abnormal morphogenesis and lactation deficiency. **Journal of Biological Chemistry**, v.275, p. 969-976, 2000.
- SORENSEN, E.S.; PETERSEN, T.E. Identification of two phosphorylation motifs in bovine osteopontin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.198, p.200-205, 1994.
- YEH, F.C.; YANG, R.C.; BOYLE, T.B.J. et al. POPGENE (VERSION 1,32): Software Microsoft Windows-based freeware for population genetics analysis. Alberta: **University of Alberta**, 1997.