



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

Fernanda de Mello¹, Daisyléa de Souza Paiva², Isabela Fonseca³, Gustavo Resende Antunes², Jaime Araújo Cobuci^{4,7}, Ary Ferreira de Freitas⁵, Celso Ribeiro Ângelo de Menezes⁶, Leandro de Carvalho Paiva⁶, Cláudio Nápolis Costa^{5,7}, Marcos Vinicius G. Barbosa da Silva⁵, Marta Fonseca Martins Guimarães⁵

¹ Mestranda do Programa de Pós-graduação em Zootecnia - UFRGS. Bolsista da CAPES. e-mail: fernandade.mello@gmail.com

² Aluno de graduação do curso de Farmácia e Bioquímica - UFJF. e-mail: daisyufff@gmail.com, guto1982@gmail.com

³ Bolsista de Apoio Técnico à Pesquisa - BAT II – FAPEMIG. e-mail: isabela_fonseca@yahoo.com.br

⁴ Professor adjunto do Departamento de Zootecnia - UFRGS. e-mail: jaimcobuci@ufrgs.br

⁵ Pesquisadores da Embrapa Gado de Leite - Juiz de Fora (MG). e-mail: ary@cnpqgl.embrapa.br, cnc8@cnpqgl.embrapa.br, marcos@cnpqgl.embrapa.br, mmartins@cnpqgl.embrapa.br

⁶ Associação Brasileira dos Criadores de Girolando. e-mail: celso@girolando.com.br, leandro@girolando.com.br

⁷ Bolsistas do CNPq

Resumo: A Osteopontina (OPN) é uma glicoproteína altamente fosforilada expressa em vários tecidos e apresenta alta expressão nas células epiteliais da glândula mamária, tendo um importante papel na proliferação e na diferenciação celular assim como no envolvimento com características de produção do leite. Estudos identificaram locos de característica quantitativa (QTL) no cromossomo 6 dos bovinos (BTA6) próximo do gene OPN para porcentagem de proteína e gordura no leite. Neste trabalho, foram genotipados 71 touros da raça Girolando para o gene candidato OPN. Foram utilizados marcadores do tipo SNP para a genotipagem dos touros pertencentes ao Teste de Progenie da raça para a identificação dos alelos do íntron 4 (C/T) do gene OPN. O DNA dos touros foi extraído e amplificado pela técnica de PCR e o produto foi digerido com a enzima de restrição *BsrI*. A frequência dos genótipos CC, CT e TT na população de touros foi de 57,75%, 38,02% e 4,23%, respectivamente. As frequências alélicas nessa população foram iguais a 76,76% para o alelo C e 23,24% para o alelo T, estando em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($P = 0,7439$). A alta frequência do alelo C nesses touros pode ser um efeito de seleção nestes animais.

Palavras-chave: características de produção do leite, Girolando, osteopontina, SNP

Association of candidate gene OPN production traits of the animals in the breed Girolando

Abstract: The Osteopontina (OPN) is a highly phosphorylated glycoprotein expressed in several tissues, which shows high expression in epithelial cells of the mammary gland and has an important role in cell proliferation and differentiation as well as involvement with the characteristics of milk production. Studies have identified the quantitative trait locus (QTL) on chromosome 6 of cattle (BTA6) close to the OPN gene on milk protein percentage and milk fat percentage. In this study the genotypes of the 71 Girolando bulls for the candidate gene OPN. Were used SNP markers for genotyping of 71 sires of the Progeny Test for the identification of alleles of intron 4(C/T) of OPN gene. DNA was amplified by PCR and the product was digested with *BsrI* restriction enzyme. The frequencies of genotypes CC, CT and TT in the population of bulls were 57.75%, 38.02% and 4.23%, respectively. The allele frequencies in this population were equal to 76.76% for allele C and 23.24% for allele T, being in Hardy-Weinberg equilibrium ($P = 0.7439$). The high frequency of C allele in bulls may be the effect of selection in these animals.

Keywords: milk production traits, Girolando, osteopontin, SNP

Introdução

A Osteopontina (OPN) é uma glicoproteína altamente fosforilada, também conhecida como Fosfo-Proteína Segregada 1 (SPP1) sendo encontrada no leite, no plasma e na urina. A primeira descrição da proteína foi como um marcador de transformação das células epiteliais (Senger et al., 1979), mas apresenta expressão em uma variedade de tecidos indicando uma multiplicidade de funções embora não tenha sido estabelecido um papel definitivo para o gene OPN. A proteína encontrada no leite apresenta alta expressão nas células epiteliais da glândula mamária, o que sugere papel importante na proliferação e na diferenciação celular assim como o envolvimento com características de produção do leite. Muitos trabalhos já identificaram locos de característica quantitativa (QTL) influenciando características de

produção do leite em raças leiteiras no cromossomo 6 de bovinos (BTA6) próximos ao gene OPN, o que o coloca como forte candidato posicional para o estudo dessas características (Zhang et al., 1998; Olsen et al., 2004). Schnabel et al. (2005) identificaram um nucleotídeo de característica quantitativa (QTN) localizado próximo da região promotora do gene OPN sendo este o responsável pela variação no percentual de proteína no leite na raça Holandesa. Similarmente, um polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP) no íntron quatro (C/T) no alelo C do gene da osteopontina foi associado com aumento nos percentuais de proteína e de gordura no leite (Leonard et al., 2005). Essa associação foi confirmada em duas populações dos EUA da raça Holandesa (Khatib et al., 2007). Devido à importância do gene OPN na produção de leite e sua associação descrita com característica de produção, como gordura e proteína, um estudo de associação entre o gene OPN com características de produção de leite em raças leiteira tropicais é de grande pertinência. A comprovação da associação do gene OPN com a produção e percentual de gordura e proteína assim como para produção de leite trará uma grande contribuição para a seleção precoce dos bovinos da raça Girolando em rebanhos nacionais. As informações do SNP do gene OPN juntamente com outros genes já descritos poderão contribuir como um conjunto de dados mais sólidos possibilitando acelerar o ganho genético. Neste contexto, o primeiro passo é a realização de estudos no Brasil que gerem informações de como o gene candidato da osteopontina está distribuído em animais da raça Girolando, raça responsável por 80% da produção de leite no Brasil (ABCG, 2009). Com base nas informações descritas previamente, o objetivo deste trabalho foi genotipar os touros pertencentes ao Teste de Progênie da raça Girolando para o polimorfismo do gene OPN, estimar as frequências alélicas e genotípicas e verificar se esse gene encontra-se em Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Material e Métodos

Amostras de sêmen foram obtidas de 71 touros participantes do Teste de Progênie da raça Girolando coordenado pela Embrapa Gado de Leite e a Associação Brasileira dos Criadores de Girolando. O DNA foi extraído das células do sêmen utilizando-se o *Dneasy Blood & Tissue Kit* (Qiagen) como recomendado pelo fabricante. As amostras foram quantificadas por espectrofotometria (Nanodrop®1000) e genotipadas para o gene OPN pela técnica de PCR-RFLP. Para a amplificação da região de interesse do gene OPN foram utilizados *primers* descritos por Leonard et al. (2005). As condições da reação de PCR foram otimizadas seguindo o procedimento descrito com algumas modificações. As reações foram realizadas em um volume final de 25 µL contendo 2,0 mmoles/L de cada dNTP, 1 U de Taq DNA Polimerase (Fermentas Life Sciences), 5 picomoles de cada *primer*, 70 ng de DNA e Tampão de PCR 1X (fornecido pelo fornecedor da enzima). As reações de PCR foram conduzidas em termociclador modelo 9700 (Applied Biosystems) com um período inicial de desnaturação a 95°C por 5 min, seguido de 40 ciclos de polimerização (95°C por 45 s, 50°C por 45 s e 72°C por 45 s) e um período adicional de polimerização a 72°C por 7 min. O produto da reação de PCR foi digerido com a enzima de restrição *BsrI* (New England Biolabs, Inc.) a 65°C por 3 h e período adicional de inativação de 80°C por 20 minutos, como recomendado pelo fabricante. O padrão de bandas foi observado em gel de agarose 1,5% corado com Brometo de Etídeo para o estabelecimento dos genótipos. Esta enzima distingue os alelos C e T do SNP localizado no íntron 4 do gene OPN. O alelo T é identificado pela presença de uma banda não digerida de 290 pb e o alelo C é identificado por uma banda de 200 pb. Para estimar as frequências gênicas e genotípicas e para verificar a existência do equilíbrio de Hardy-Weinberg foi utilizado o programa GENEPOP web version 1.2. <<http://genepop.curtin.edu.au/>>. A probabilidade de Equilíbrio de Hardy-Weinberg associado às frequências genotípicas observadas foram testadas pelo teste χ^2 (Qui-Quadrado) e o nível de significância de 5%.

Resultados e Discussão

As frequências alélicas e genotípicas e o Equilíbrio de Hardy-Weinberg para o gene OPN são apresentados na Tabela 1. As frequências genotípicas CC, CT e TT diferiram na população, 57,75%, 38,02% e 4,23% respectivamente, mas não se distanciam do número de animais esperado, estando em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Os valores da frequências dos alelos C e T, 76,76% e 23,24%, respectivamente, indicam que os mesmos não estão igualmente distribuídos nestes touros. Estes resultados discordam dos obtidos por Leonard et al. (2005) na raça Holandesa, os quais encontraram os alelos do gene OPN igualmente distribuídos na população de animais em estudo, com frequência de 49% e 51% para o alelo C e T, respectivamente. A população de touros da raça Girolando apresentou um número maior de indivíduos heterozigotos que o esperado e um número inferior de animais homozigotos quando comparado com outros estudos de frequências alélica e genotípica. Embora as relações entre os genótipos estejam de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg a baixa frequência do alelo T pode ser reflexo do direcionamento da pressão de seleção exercida sobre esses animais para características de produção de leite o que, talvez, revele possíveis correlações entre as características de interesse econômico selecionadas simultaneamente. O alelo C, por sua vez, já foi identificado em outras raças associado ao maior percentual de gordura e proteína no leite e possivelmente esta seja a causa da frequência elevada nestes touros, o que estaria de acordo com o histórico de seleção da raça. Khatib et al. (2007) encontraram frequências genotípicas do gene OPN de CC, CT e TT de 23%, 51% e 26%, respectivamente, na raça Holandesa e

Tabela 1- Frequências genótípicas, gênicas e probabilidades de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HW-E).

Genótipo	Nº de Animais		Frequências		Equilíbrio Hardy-Weinberg
	Observado	Esperado	Genotípica	Alélica	
CC	41	41,745	0,5775	(C) 76,8	0,7439
CT	27	25,511	0,3802		
TT	03	3,745	0,0423	(T) 23,2	

estimaram o efeito aditivo do alelo C para características de percentual de gordura e proteína ($P < 0,0001$). De mesmo modo, Leonard et al. (2005) estimaram um efeito aditivo do alelo C do gene OPN para o percentual de proteína ($P = 0,0255$) e gordura ($P = 0,0480$) no leite. A baixa frequência do alelo T nos touros Girolando pode também nos indicar uma seleção para características de conformidade corporal de correlação negativa com características de produção, como observado por Schnabel et al. (2005). Esses autores realizaram estudo de associação do microssatélite do gene OPN com 20 características de conformação corporal e encontraram apenas associação significativa entre o alelo mutado do microssatélite para posição das pernas ($P = 0,024$) na raça Holandesa, o que pode indicar que a mutação no gene OPN estudada provavelmente não influencia nenhuma característica de conformação corporal sob seleção naquela população. Estudos de associação na raça Girolando seriam necessários para caracterizar estas possíveis associações. Os resultados das genotipagens do gene OPN encontrados nesta população de touros irão integrar as bases de dados para estimações do valor genéticos de cada animal e de sua progênie, permitindo a implementação de futuros estudos visando verificar possíveis associações do OPN com a produção de leite e de seus componentes como gordura e proteína.

Conclusões

Foi observada que os alelos C e T estão em Equilíbrio de Hardy-Weinberg na população de touros Girolando pertencentes ao Teste de Progênie da raça. Embora os genótipos estejam em equilíbrio de Hardy-Weinberg, a baixa frequência do alelo T indica que os alelos do gene OPN não estão igualmente distribuídos na população de touros. Estudos com um maior número de animais são necessários para avaliar com maior precisão a frequência de distribuição do alelo T do íntron 4 do gene OPN na raça Girolando, uma vez que só foram genotipados os touros que participam do Teste de Progênie.

Agradecimentos

Agradecemos a equipe do Laboratório de Genética Molecular da Embrapa Gado de Leite e a Associação Brasileira dos Criadores de Girolando pela ajuda e apoio no desenvolvimento deste trabalho. À Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e a CAPES pela concessão da bolsa e pelo auxílio financeiro. Este trabalho foi financiado com recursos do Programa Agrofuturo da Embrapa.

Literatura citada

- ABCG - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE GIROLANDO, São Paulo, SP, 2009. Disponível em: <www.girolando.com.br> Acesso em: 19/3/2009.
- KHATIB, H.; ZAITOUN, L.; WIEBELHAUS-FINGER, J. et al. The Association of Bovine *PPARGC1A* and *OPN* Genes with Milk Composition in Two Independent Holstein Cattle Populations. **American Dairy Science Association**, v. 90, n.6, p.2966–2970. 2007
- 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, n.11, p.4083–4086. 2005.
- RAYMOND, M.; ROUSSET, F. [1995]. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. **Journal Heredity**, v.86, p.248-249. Disponível em: <<http://genepop.curtin.edu.au/>>. Acesso em 19/3/2009.
- SCHNABEL, R.D.; KIM, J.J.; ASHWELL, M.S. et al. Fine-mapping milk production quantitative trait loci on BTA6: Analysis of the bovine osteopontin gene. **The National Academy Sciences of the USA**, v.102, n.19, p.6896–6901. 2005.
- ZHANG, Q.; BOICHARD, D.; HOESCHELE, I. et al. Mapping QTL for milk production and health of dairy cattle in a large outbred pedigree. **Genetics**, v.149, p.1959–1973. 1998.