

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

Milla Albuquerque de Souza, Marcos Vinicius Gualberto Barbosa da Silva, Claudio Napolis Costa, Daisyléa de Souza Paiva, Larissa Helena da Rocha Meira, Marta Fonseca Martins Guimarães

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 visualização dos genótipos foi realizada após a digestão com as enzimas de restrição Taq I, Hae III, Pst I, Bsr I e Ava I, para os genes CD18, LGB, DGAT1, OPN e UMPS, respectivamente. 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

Frequency of allelic variants of LGB, OPN, BLAD, DGAT1, CVM and DUMPS genes

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. Visualization of the genotypes was performed after digestion with restriction enzymes Taq I, Hae III, Pst I, Bsr I and Ava I, for the CD18, LGB, DGAT1, OPN and UMPS genes, respectively. 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

Há crescente interesse na utilização de genes candidatos relacionados com características de importância econômica em gado leiteiro, como para aqueles relacionados a aumentos na produção de leite e queijo (DGAT1, OPN e LGB) e doenças hereditárias (DUMPS, CVM e BLAD).

O DGAT1 (diacilglicerol O-aciltransferase 1) 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. O alelo A, fixado na maioria das raças zebuínas, está associado ao aumento na produção de proteína e de leite. O alelo K, com alta frequência em raças européias, está associado à diminuição da produção de proteína e aumento na produção de gordura no leite (KAUPE et al., 2007).

A osteopontina (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. O alelo C está associado ao aumento na porcentagem de proteína e gordura no leite e o alelo T com aumento na produção de leite (KHATIB et al., 2007).

A Beta-Lactoglobulina (LGB) representa aproximadamente 55% das proteínas do soro de leite de ruminantes, porém não está presente em humanos, podendo ser um dos responsáveis pela intolerância à proteína do leite de vacas nessa espécie. O gene LGB encontra-se no cromossomo 11 (BTA11) de bovinos, sendo que as variantes A e B diferem nos aminoácidos de posição. Alguns trabalhos evidenciam que a variante A está associada à maior produção de leite, enquanto a variante B está relacionado ao maior rendimento de gordura e proteína, portanto mais indicada para produção de derivados lácteos, como queijo (MEDRANO et al., 1990).

A DUMPS (Deficiência de Uridina Monofosfato Sintetase) é uma desordem monogenética 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 (em torno de 40 dias de gestação). Isso ocorre, pois a UMPS é a enzima responsável pela conversão do ácido orótico para uridina monofosfato (UMP), a qual é um componente essencial para a síntese de pirimidinas. A única manifestação clínica é o aumento da taxa de retorno de serviço, devido ao fim dessas gestações pela morte embrionária precoce, com isso, a fertilidade é reduzida. Os portadores (heterozigotos) são fenotipicamente normais, porém apresentam apenas 50% da atividade normal dessa enzima. O genótipo DP está associado ao animal carreador de DUMP e o TD ao animal não carreador da desordem (SCHWENGER et al., 1993).

O Complexo de Má Formação Vertebral Cervical (CVM) é autossômico recessivo, causado por uma mutação do ponto G para o T no nucleotídeo de posição 559 do gene *bovine solute carrier family 35 member 3 (SLC35A3)*, que altera a sequência de aminoácidos da uridina difosfato-59 N-acetilglucosamina proteína transportadora da valina a fenilalanina na posição 180. Bezerros homozigotos para CVM podem ser reabsorvidos, abortados ou natimortos. Alguns podem vir a nascer, mas quase sempre serão prematuros em uma ou duas semanas e apresentarão baixo peso ao nascimento, encurtamento da coluna cervical e torácica, cifose ou escoliose nas colunas cervicais e/ou torácica, artrogripose bilateral simétrica das articulações distais e malformações cardíacas em alguns casos. Já animais portadores de apenas um alelo da CVM são normais, podendo apresentar baixas taxas de prenhez quando cruzados com outros portadores (GHANEM et al., 2008).

BLAD (Deficiência de Adesão Leucocitária Bovina) é uma doença caracterizada por uma reduzida expressão de moléculas de adesão em neutrófilos, chamado α -integrinas (um complexo de CD11/CD18 família de proteínas que são estruturalmente e funcionalmente ligados às glicoproteínas). A doença é causada por uma mutação pontual recessiva, que substitui adenina em 383 com guanina, e que muda um aminoácido, ácido aspártico em glicina. A mutação conduz finalmente a uma proteína (CD18) cuja função é prejudicada. É uma doença hereditária comum na raça Holandesa. Animais homozigotos para essa mutação apresentam crescimento retardado, perda de dentes, comprometimento do sistema imune e morrem ainda novos, geralmente, de pneumonia. Animais heterozigotos (portadores do alelo recessivo) apresentam desenvolvimento normal e ainda

estão relacionados com aumento na produção de leite e porcentagem de gordura e proteína. O genótipo BL indica que o animal é portador de BLAD e o TL não é portador da doença (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 Progenie da raça Holandesa, coordenado pela Embrapa Gado de Leite e pela Associação Brasileira de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa. Foram coletadas amostras de sêmen e/ou sangue, sendo que o DNA das amostras foi extraído utilizando o DNeasy 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 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 (MEDRANO et al., 1990; KHATIB et al., 2007; SHUSTER et al., 1992; KAUPÉ et al., 2007; SCHWENGER et al., 1993) e as condições da PCR foram otimizadas quanto à concentração dos reagentes e da temperatura de anelamento. 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. Todas as reações foram conduzidas no termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Para estabelecimento dos genótipos, o produto digerido foi observado em gel de agarose 3%. Os animais portadores de BLAD apresentam o padrão de 58, 32 e 26 pb para *Taq* I e 49, 30, 19 e 9 pb para *Hae* III. Já os animais normais apresentam o padrão de 32 e 26 para *Taq* I e 49 e 9 pb para *Hae* III. A PCR produz, para o LGB, um fragmento de 262 pb que quando digerido pode produzir o seguinte padrão: genótipo AA é caracterizado pela presença de duas bandas, uma de 153 pb e outra de 109 pb; genótipo BB apresenta três bandas, com 109, 79 e 74 pb cada e genótipo AB possui quatro bandas com 153, 109, 79 e 74 pb cada. No caso do OPN dois padrões de bandas foram observados, caracterizando os dois diferentes alelos: o alelo T, identificado pela presença de uma banda não digerida de 290 pb e o alelo C, duas bandas (200 e 90 pb). Para o gene UMPS foi observado o padrão de bandas de 53 e 36 pb para animais normais e 89, 53 e 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. Para o gene DGAT1, a frequência da variante K foi de 84,8% e da A 15,2%, sendo a variante K relacionada à maior produção de queijo. A frequência da variante C foi de 41,3% e da T, 58,7%, para o gene OPN, sendo a variante T relacionada à maior produção de leite. No caso da LGB, a variante A obteve frequência de 56,8% e a B 43,2%, predominando a variante A, 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.

Para o gene DUMPS, as frequências alélicas das variantes T e P foram iguais a 50%. Para o gene BLAD, foi de 47,8% (T) e 52,2% (B), estando bem distribuída na população, havendo predominância do portador B. 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 ($P < 0,05$).

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 | 6,9182 |
| | AB | 5 | 11,0465 | 0,2381 | | |
| | BB | 7 | 3,9767 | 0,3333 | (B) 0,432 | |
| DUMPS | TD ¹ | 21 | 10,7561 | 1,05 | (T) 0,500 | 14,878 |
| | DP ² | 0 | 5,1220 | 0 | (P) 0,500 | |
| CVM | 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.

No caso do CVM, as frequências alélicas diferiram muito, sendo na variante T foi de 97,8% e na C 0,22%. A baixa frequência do alelo letal pode ter acontecido devido ao tamanho da amostra, já que somente os touros em teste foram genotipados. De acordo com a análise estatística, para o gene CVM, 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, A e T, respectivamente. Já os genes DUMPS, LGB e BLAD não se encontram em equilíbrio genético, de acordo com o postulado por Hardy-Weinberg.

Agradecimentos

À Embrapa Gado de Leite e a Fapemig/Pibic pelo suporte e oportunidade de desenvolver o presente trabalho.

Referências

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 *PPARGC1A* 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.