

Frequências genotípicas e alélicas dos genes *DGAT1* e *OPN*

Willian Pascoa Pereira, João Vitor Paes Rettore, Germano Roberto da Silveira Pereira, Isabela Gomes Barreto da Motta, Isabella Silvestre Barreto Pinto, Isabela Fonseca, Wagner Antonio Arbex, Marcos Vinícius G. B. Silva, Marta Fonseca Martins

Resumo

Os genes *DGAT1* e *OPN* fazem parte de um grupo de genes responsáveis por características de produção do leite. O gene *DGAT1* apresenta um polimorfismo no exon VIII aonde há a substituição de dois nucleotídeos (AA/GC), tal polimorfismo está associado com o produção de gordura e proteína. Já o gene *Osteopontina* (*OPN*) está associado a associado à produção de leite e gordura e porcentagem de gordura e proteína. Com o objetivo de verificar as frequências genotípicas e alélicas dos genes *DGAT1* e *OPN* em bovinos pertencentes ao Teste de Progênie da Raça Girolando, foram genotipados 761 animais. No gene *DGAT1* as frequências genotípicas encontradas foram 0,0250 (AA), 0,4790 (AK) e 0,4960 (KK) enquanto as frequências alélicas foram 0,2641 (A) e 0,7359 (K). No gene *OPN* as frequências genotípicas encontradas foram 0,0982 (CC) 0,4304 (CT) e 0,4714 (TT) e as frequências alélicas foram 0,3134 (C) e 0,6866 (T). Tal população não se encontra em EHW para o gene *DGAT1* a 5% de probabilidade visto que as frequências observadas diferem das frequências esperadas no equilíbrio. Porém, a população encontra-se em EHW para o gene *OPN* a 5% de probabilidade visto que as frequências observadas não diferem das frequências esperadas no equilíbrio.

Palavras-chave: acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase1; osteopontina; produção de leite.

Genotypic and Alelic Frequencies of the *DGAT1* and *OPN* Genes

Abstract

DGAT1 and *OPN* genes are part of a group of genes responsible for milk characteristics. The acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase1 (*DGAT1*) gene has a polymorphism in exon VIII where there is the replacement of two nucleotides (AA/GC); such polymorphism is associated with increase in milk and protein production or decrease in proteins production. The *Osteopontin* (*OPN*) gene is associated with an increase in percentage of protein and fat in milk or weight gain of the offspring. This study aimed to verify the allele and genotype frequencies of *DGAT1* and *OPN* genes in cattle belonging to the Progeny Test of Girolando breed, coordinated by Embrapa Dairy Cattle and the Brazilian Association of Girolando Breeders, for that 761 animals were genotyped. On *DGAT1* gene the genotypic frequencies were 0,0250 (AA), 0,479 (AK) e 0,4960 (KK), while allelic frequencies were 0,2641 (A) and 0,7359 (K). On *OPN* gene the genotypic frequencies were 0,0982 (CC), 0,4304 (CT) e 0,4714 (TT) and allelic frequencies were 0,3134 (C) and 0,6866 (T). Such population does not finds itself in HWE for the *DGAT1* gene at 5% of probability as the observed frequencies differ from the expected frequencies. However, the population finds itself in HWE for the *OPN* at 5% of probability as observed frequencies do not differ from expected frequencies.

Keywords: acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase1; milk production; osteopontin.

Introdução

A seleção assistida por marcadores tem um grande potencial para alavancar o progresso genético na criação de animais de produção, além disso, marcadores de DNA podem ser uma ferramenta nas decisões de gestão provendo uma indicação dos possíveis méritos genéticos para uma produção específica.

Com o sequenciamento do DNA de bovinos, foram descobertos vários genes com polimorfismo que podem melhorar, por exemplo, a produção de leite ou aumentar o teor de gordura no leite.

O gene *acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase1* (*DGAT1*) foi identificado como um gene candidato para características de produção de leite na região centromérica do cromossomo 14 de bovinos (GRISART et al., 2004). A *acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase* regula a taxa de triglicérides nos adipócitos, e está associado com a energia homeostática. Um polimorfismo no exon VIII deste gene, no qual ocorre a substituição de uma lisina por uma alanina (K232A) resulta na substituição de dois nucleotídeos (AA/GC) (WINTER et al., 2002). O alelo A está associado com o aumento da produção de leite e proteínas enquanto o alelo K está associado com a diminuição da produção de proteína e aumento de gordura no leite (GRISART et al., 2002).

A Osteopontina (OPN) é uma glicoproteína altamente fosforilada cujo gene (*OPN*) já foi clonado e sequenciado em diferentes espécies. O gene OPN em bovino consiste de 6 exons com cerca de 7 kb e codifica uma proteína de 278 aminoácidos (KERR et al., 1991). O alelo C está associado a um aumento nas porcentagens de proteína e gordura no leite enquanto o alelo T está associado a um maior ganho de peso da prole.

O trabalho teve como objetivo avaliar as frequências alélicas e genotípicas dos genes *DGAT1* e *OPN* e verificar se estes se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) na população analisada.

Material e Métodos

Foram genotipados 762 animais para os genes *DGAT1* e *OPN* sendo, 125 machos e 637 fêmeas pertencentes ao Programa de Melhoramento da Raça Girolando, coordenado pela Embrapa Gado de Leite e Associação Brasileira dos Criadores de Girolando.

A extração do DNA do sangue e sêmen dos animais foi feita utilizando o kit de extração *DNasey® Blood & Tissue Kit* (Qiagen, Hilden, Alemanha) de acordo com as recomendações do fabricante. A quantificação das amostras foi feita por espectrofotometria (Nanodrop®, Wilmigton, DE, EUA). Os genótipos foram estabelecidos utilizando a técnica de PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism PCR*), tendo as condições otimizadas com relação à concentração de reagentes e temperatura de anelamento usando termociclador GeneAmp PCR System 9700 (*Applied Biosystem, Forster City, CA, EUA*). A digestão para *DGAT1* foi feita utilizando a enzima *Eae I* (*New England Biolabs, EUA*) e para *OPN* foi utilizada a enzima *Bsr I* (*New England Biolabs*) e os fragmentos formados foram observados em gel de agarose 1,5% (*DGAT1*) e 2% (*OPN*) corados com brometo de etídio.

Para o gene *DGAT1* o genótipo AA é caracterizado pela presença de dois fragmentos, um de 208 e outro de 203 pb, o genótipo AK é caracterizado pela presença de três fragmentos (411, 208 e 203 pb), o genótipo KK apresenta apenas um fragmento de 411 pb.

No gene *OPN* o genótipo TT é caracterizado pela presença de um fragmento de 290 pb, o genótipo TC é caracterizado pela presença de três fragmentos (290, 200 e 90 pb) e o genótipo CC apresenta dois fragmentos, um de 200 e outro de 90 pb.

As frequências alélicas, genotípicas e o cálculo da probabilidade de EHW foram estabelecidos por meio do programa *Popgen* 1.32 (YEH et al., 1997). A probabilidade de EHW associado às frequências genotípicas observadas foi testada pelo teste χ^2 (Qui-Quadrado) ao nível de significância de 5%.

Resultados e Discussão

As frequências genotípicas do gene *DGAT1* foram 0,0250 (AA), 0,4790 (AK) e 0,4960 (KK) enquanto que as frequências alélicas foram 0,2641 (A) e 0,7359 (K) como pode ser visto na Tabela 1. No gene *OPN* as frequências genotípicas foram 0,0982 (CC) 0,4304 (CT) e 0,4714 (TT) e as frequências alélicas foram 0,3134 (C) e 0,6866 (T) como pode ser visto na Tabela 2. A genotipagem dos animais pode ajudar produtores a melhor selecionar seus rebanhos dependendo do destino que eles desejam dar ao leite produzido. Produtores interessados em aumentar a produção de leite e de proteínas devem escolher animais com o genótipo AA para o gene *DGAT1*, caso precisem de um leite com mais gordura devem escolher animais com genótipo KK para o gene *DGAT1* ou animais com o genótipo KK para *DGAT1* e CC para *OPN* aonde terão um leite com ainda mais gordura

Tal população não se encontra em equilíbrio de Hardy-Weinberg para os alelos A e K do gene *DGAT1* a 5% de probabilidade visto que as frequências observadas e esperadas se diferem, significando que a população pode estar sofrendo seleção para o alelo K. De modo diferente, esta população se encontra em equilíbrio de Hardy-Weinberg para os alelos C e T do gene *OPN* a 5% de probabilidade, visto que as frequências observadas não diferem das frequências esperadas no EHW.

Tabela 1. Frequências alélicas e genotípicas do gene *DGAT1*.

Genótipo	Número de Animais		Frequência		EHW*
	Observado	Esperado	Genotípica	Alélica	
AA	19	52,9921	0,0250	0,2641 (A)	40,222563
AK	364	296,0158	0,4790		
KK	378	411,9921	0,4960	0,7359 (K)	

A = está associado com o aumento da produção de leite e proteínas.

* $P < (0,05)$.

K = está associado com a diminuição da produção de proteína e aumento de gordura no leite.

Tabela 2. Frequências alélicas e genotípicas do gene *OPN*.

Genótipo	Numero de Animais		Frequência		EHW*
	Observado	Esperado	Genotípica	Alélica	
CC	69	74,6391	0,0982	0,3134 (C)	0,902822
CT	339	327,7219	0,4304		
TT	353	358,6391	0,4714	0,6866 (T)	

C = está associado a um aumento nas porcentagens de proteína e gordura no leite.

* $P < (0,05)$.

T = está associado a um maior ganho de peso dos descendentes.

Conclusões

A população estudada não se encontra em EHW para o gene *DGAT1*, porem esta população se encontra em EHW para o gene *OPN*.

Agradecimentos

A Embrapa Gado de Leite, ao CNPq, e à Fapemig pelo apoio ao desenvolvimento dessa pesquisa.

Referências

GRISART, B.; COPPIETERS, W.; FARNIR, F.; KARIM, L.; FORD, C.; BERZI, P.; CAMBISANO, N.; MNI, M.; REID, S.; SIMON, P.; SPELMAN, R.; GEORGES, M.; SNELL, R. Positional Candidate Cloning of a QTL in Dairy Cattle: Identification of a Missense Mutation in the Bovine *DGAT1* Gene with Major Effect on Milk Yield and Composition. **Genome Res.** 2002 12: 222-231. 2002.

GRISART, B.; FARNIR, F.; KARIM, L.; CAMBISANO, N.; KIM, J. J.; KVASZ, A.; MNI, M.; SIMO, N. P.; FRERE J. M.; COPPIETERS W.; Georges M. Genetic and functional confirmation of the causality of the *DGAT1* K232A

quantitative trait nucleotide in affecting milk yield and composition. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA 101 (8), 2398-2403. 2004.

KERR, J. M.; FISHER, L. W.; TERMINE, J. D.; YOUNG, M. F. The cDNA cloning and RNA distribution of bovine osteopontin. **Gene** 108:237–243. 1991.

WINTER, A.; KRAMER, W.; WERNER, F. A.; KOLLER, S. S.; KATA, S.; DURSTEWITZ, G.; BUITKAMP, J.; WOMACK, J. E.; THALLER, G.; FRIES, R. Association of a lysine 232/alanine polymorphism in a bovine gene encoding acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase (DGAT1) with variation at a quantitative trait locus for milk fat content. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA 99 (14), 9300-9305. 2002

YEH, F. C.; YANG, R. C.; BOYLE, T. B. J. **POPGEN (VERSION 1.32)**: Software Microsoft Windows-based freeware for population genetics analysis. Alberta: University of Alberta. 1997.