

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

POLIMORFISMO DE VNTR NA REGIÃO PROMOTORA DO  
GENE *DGATI* EM BOVINOS LEITEIROS, CAPRINOS E  
OVINOS

Autor (a): Fabiane Luizetti  
Orientador (a): Prof. Dra. Eliane Gasparino

MARINGÁ  
Estado do Paraná  
Fevereiro-2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

POLIMORFISMO DE VNTR NA REGIÃO PROMOTORA DO  
GENE *DGATI* EM BOVINOS LEITEIROS, CAPRINOS E  
OVINOS

Autor (a): Fabiane Luizetti  
Orientador (a): Prof. Dra. Eliane Gasparino

Dissertação apresentada, como parte das exigências para a obtenção do título de MESTRE EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá – Área de concentração Produção Animal.

MARINGÁ  
Estado do Paraná  
Fevereiro-2010

“Plante seu jardim e decore sua alma, ao invés de esperar que alguém lhe traga flores. E você aprende que realmente pode suportar, que realmente é forte, e que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais. E que realmente a vida tem valor e que você tem valor diante da vida!”

*William Shakespeare*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, mais uma vez, pela oportunidade de continuar meus estudos, pela força nos momentos difíceis e por terem paciência no estresse final.

Agradeço ao meu irmão, Fabrício, pelas voltas e arejadas, por me fazer rir e me tornar uma pessoa mais feliz.

À Professora Eliane, pela confiança investida, pela paciência durante todo o curso e pela oportunidade de crescer sempre mais.

Aos meus novos amigos, em especial Belisa, Bruna e Flávia, responsáveis por um ano cheio de novidades, ao João Henrique e à Cristiane Pina, pela força em não desistir de tudo, e à Cátia e ao Bruno, colegas de faculdade que se tornaram verdadeiros amigos.

À Professora Maria Amélia e todo pessoal do laboratório de genética da UNIOESTE em Cascavel, pelos ensinamentos e amizade.

## BIOGRAFIA

FABIANE LUIZETTI, filha de Carlos Luizetti Filho e Maria Celina Remoli Luizetti, nasceu no município de Agudos, São Paulo, no dia 9 de julho de 1983.

Em 2001 iniciou no curso de graduação em Zootecnia pela Universidade Estadual de Maringá, com conclusão em 2005.

Em 2007, iniciou no Programa de Pós-graduação em Zootecnia, em nível de mestrado, área de concentração produção animal, na Universidade Estadual de Maringá, realizando estudos na área de melhoramento genético animal.

Em 2009, iniciou o curso de graduação em Medicina Veterinária pelo Centro Universitário de Maringá com conclusão prevista para o ano de 2011.

Submeteu-se à banca examinadora para a defesa da dissertação no dia 22 de fevereiro de 2010.

## ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
ÍNDICE DE TABELAS.....	viii
RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	3
I. INTRODUÇÃO GERAL.....	4
1.1. O leite e seus componentes.....	4
1.2. Componentes lipídicos.....	4
1.3. Marcadores moleculares.....	5
1.4. Gene <i>DGATI</i> .....	6
1.5. VNTR.....	7
1.6. Referências.....	9
II. OBJETIVOS GERAIS.....	12
III. FREQUÊNCIA GÊNICA E GENOTÍPICA DO VNTR DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE <i>DGATI</i> EM BOVINOS LEITEIROS.....	13
Resumo.....	13
Abstract.....	14
Introdução.....	15
Material e Métodos.....	16
Resultado e Discussão.....	18
Conclusões.....	22
Referências.....	23

IV. POLIMORFISMO DE VNTR DO GENE <i>DGATI</i> EM BOVINOS, CAPRINOS E OVINOS.....	25
Resumo.....	25
Abstract.....	26
Introdução.....	27
Material e Métodos.....	28
Resultados e Discussões.....	29
Conclusões.....	32
Referências.....	33

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1: Representação do fragmento de VNTR do gene <i>DGATI</i> de <i>Bos taurus</i> , número de acesso ao GenBank AJ318490 .....	8
FIGURA 1': Gel de poliacrilamida 12%.....	21
FIGURA 1'': Polimorfismo na região promotora em gel de poliacrilamida comparando as espécies bovina, ovina e caprina.....	30
FIGURA 2: Polimorfismo na região promotora do gene <i>DGATI</i> em caprinos.....	30

## ÍNDICE DE TABELAS

	Página
TABELA 1: Tamanho dos fragmentos encontrados em cada alelo da região de VNTR do gene <i>DGATI</i> em bovinos leiteiros.....	18
TABELA 2: Frequência genotípica observada e esperada da população amostrada considerando a região promotora do gene <i>DGATI</i> .....	21

## RESUMO

O gene *DGATI* é um gene candidato envolvido com o conteúdo de gordura no leite e em razão de sua função fisiológica, esse gene é de grande interesse para o melhoramento dos rebanhos leiteiros. Este gene apresenta uma região com VNTR com poucas informações, mas sugere que o polimorfismo nesta região possa estar relacionado à variação na produção. Neste estudo foram analisadas amostras de DNA de 72 bovinos leiteiros através de amostras de sangue retiradas da veia caudal dos animais. A frequência genotípica e gênica para o polimorfismo VNTR do gene *DGATI*, foram obtidas diretamente após amplificação por PCR. Foram encontrados quatro alelos, presentes em homozigose e heterozigose, cujas frequências foram: alelo 1 (com três repetições) de 4%, alelo 2 (com quatro repetições) de 50%, alelo 3 (com cinco repetições) de 40% e alelo 4 (com seis repetições) de 6%. Foi verificado o equilíbrio de Hardy-Weinberg através do teste de Qui-quadrado concluindo que a população não se encontrava em equilíbrio.

A maior parte dos estudos sobre *DGATI* é feita em bovinos por causa de sua maior representatividade na produção leiteira. Entretanto, caprinos e ovinos também apresentam uma produção de leite considerável no mercado. Utilizando-se de primers previamente desenhados para a espécie bovina, foram comparados os fragmentos amplificados da região promotora do gene *DGATI* em bovinos, caprinos e ovinos. A extração do DNA genômico foi feita a partir de amostras de sangue. Os primers desenhados se mostraram pouco eficientes, apesar de amplificar na região esperada com fragmentos entre 700 e 800 pares de base nas três espécies, uma pequena porcentagem dos indivíduos amostrados apresentou qualquer resultado, que provavelmente ocorreu pela alta variação nucleotídica na região de anelamento dos primers. Foi encontrado um

polimorfismo de VNTR na região promotora do gene *DGATI* nas raças Alpina e Saanen.

## ABSTRACT

The *DGATI* gene is a candidate gene involved in fat content in milk and due to its physiological function, this gene is of great interest for dairy cattle improvement. This gene presents a VNTR region with little information, but it suggests that the polymorphism in this region may be related to variations in production. This study analyzed DNA samples from 72 dairy cattle using blood samples taken from tail vein of animals. The genotype and gene frequency of VNTR polymorphism in the *DGATI* gene was obtained directly after PCR amplification. It was found four alleles present in homozygous and heterozygous, whose frequencies were: allele 1 (with three repetitions) of 4%, allele 2 (with four repetitions) of 50%, allele 3 (with five repetitions) of 40% and allele 4 (with six repetitions) of 6%. It was verified the Hardy-Weinberg equilibrium by Chi-square test concluding that the population was not in balance.

Most studies on *DGATI* are made in cattle due to its higher representation in milk production. However, goats and sheep also have a production of milk in the market. Using the primers designed previously for the bovine species, the amplified fragments of the promoter region of *DGATI* gene were compared in cattle, goats and sheep. The extraction of genomic DNA was made from blood samples. The primers designed were not efficient, because although the region expected amplified with fragments between 700 and 800 base pairs in the three species, a small percentage of the individuals had any result, which probably occurred due to the high nucleotide variation in the region of annealing primers. There were found a VNTR polymorphism in the promoter region of the *DGATI* gene in Alpine and Saanen breeds.

## I. INTRODUÇÃO GERAL

### 1.1. O leite e seus componentes

O leite é um alimento completo para mamíferos neonatos, sua composição varia entre as diversas espécies e mesmo dentro da mesma espécie, dependendo do estágio de lactação, alimentação recebida e estação do ano em que o animal se encontra.

Estudos voltados a essa temática são de suma importância considerando-se a relevância do leite na alimentação humana. O leite é um complexo fluido biológico que contém um balanço de nutrientes (proteínas, gordura, lactose e minerais), que têm função preliminar de assegurar o crescimento e o desenvolvimento do mamífero recém-nascido.

Na maioria das espécies, a lactose é o componente mais estável do leite, que por sua vez, é pouco influenciado por fatores ambientais. Entretanto, os demais componentes sofrem interferência de fatores genéticos, ambientais, biológicos, período de lactação, raça, idade e nível nutricional que influenciam na qualidade, composição química e nas propriedades do leite.

### 1.2. Componentes lipídicos

A gordura é o principal componente energético do leite, composta de ácidos graxos de variados comprimentos de cadeia e grau de saturação. É o componente do leite que possui a maior taxa de variação, podendo oscilar entre 2 e 3 pontos percentuais (Peres,

2001). Essa cadeia de ácidos graxos para a síntese da gordura que é exportada para o leite pode ser adquirida de duas fontes: da digestão dos alimentos e da síntese que ocorre em alguns órgãos como o fígado (Develin, 2000 *in* Mioranza, 2006 e Shennan e Peaker, 2000).

A síntese dos lipídeos do leite ocorre no retículo endoplasmático liso das células da glândula mamária (Lehner et al., 1996). Nos mamíferos além da via do glicerol-3 fosfato para formação do triacilglicerol existe também a do monoacilglicerol que utiliza o diacilglicerol incorporado pela alimentação, sendo este resultado da ação das lípases no lúmen do intestino (Winter et al., 2003 *in* Mioranza, 2006).

Em cabras, os glóbulos de gordura liberados pelas células epiteliais da glândula mamária são de menor tamanho comparados aos da vaca, e isso ocorre pela maior quantidade de triglicérides de cadeia média, favorecendo sua absorção e ação das lípases (Alfárez et al., 2001).

O triacilglicerol compõe a maior parte de todo o conteúdo de gordura, obtendo em torno de 95% da fração total dos lipídios (Grisart et al., 2004). Fazendo uma comparação com as frações dos conteúdos de gordura de caprino com bovinos é possível observar uma similaridade entre as concentrações destas duas espécies.

### 1.3. Marcadores moleculares

O uso de seleção fenotípica em longo prazo pode alterar a frequência gênica, afetando um ou mais caracteres, resultando, além da resposta direta no caractere selecionado, também em respostas correlacionadas em muitos outros caracteres. Em virtude do desenvolvimento da biologia molecular, tornou-se possível o estudo mais detalhado de genes envolvidos com características quantitativas. A seleção assistida por marcadores moleculares, principalmente para características de baixa herdabilidade e de difícil mensuração, possibilitou avanços para os programas de melhoramento genético.

Os marcadores genéticos podem ser derivados de qualquer tipo de dado molecular que forneça um polimorfismo detectável entre os organismos a serem comparados. Dentro de marcadores destacam-se os microssatélites, que são caracterizados por uma sequência de nucleotídeos abundantes, distribuídos ao acaso por todo genoma (Menezes et al., 2006), sendo que o polimorfismo alélico ocorre em um loco microssatélite em razão da mudança no número de repetições.

Esses marcadores moleculares são ferramentas poderosas no estudo dos genes que participam da expressão de características de interesse econômico. O uso de marcadores diretos, que buscam polimorfismos dentro do próprio gene, é uma possibilidade atrativa e com perspectiva de utilização em curto prazo.

Muitos genes que apresentam polimorfismos conhecidos e com aplicações confirmadas já foram descritos e alguns patenteados, sendo que muitos genes polimórficos apresentam interesse econômico, dentre eles, o gene *DGATI* que codifica a enzima Diacilglicerol Aciltransferase 1 (Cases et al., 1998).

#### 1.4. Gene *DGATI*

O *DGATI* bovino tem aproximadamente 8,6 Kb e compreende 17 éxons, medindo em média 121,8 pares de base e a conformação dos íntrons é estritamente conservada entre humanos e bovinos (Grisart et al., 2004). O gene codifica uma enzima formada por 489 aminoácidos, envolvida na biossíntese de triglicerídeos, que se expressa em muitos tecidos, com os mais altos níveis de expressão no intestino, testículo, tecido adiposo, glândulas mamárias e tecido epitelial (Cases et al., 1998).

O gene *DGATI* é um gene candidato envolvido com o conteúdo de gordura no leite. Em razão de sua função fisiológica (aumentar a velocidade da síntese de triacilglicerol), o *DGATI* é de grande interesse para os criadores de rebanho leiteiro e também para criadores de rebanho de corte, uma vez que as vias de formação da gordura intramuscular (marmoreio) são semelhantes (Thaller et al., 2003(a)).

O *DGATI* tornou-se um gene candidato funcional e posicional para o conteúdo de gordura no leite, baseado, respectivamente, no fenótipo de ausência de lactação observada em camundongos deficientes do gene e em virtude da sua posição próxima a um QTL identificado no cromossomo 14 de bovinos (Riquet et al., 1999). Na última década grandes esforços têm sido empregados para a construção dos mapas físico e genéticos do genoma bovino que atualmente contam com mais de 4.000 marcadores, em sua maioria, marcadores microssatélites, SNPs (single nucleotide polymorphism) e também ESTs (expressed sequence tags) (Ihara et al., 2004).

Bennewitz et al. (2004) relacionaram variações no gene *DGATI* com a produção quantitativa de leite em bovinos. O *DGATI* codifica a enzima diacilglicerol aciltransferase 1 que catalisa a reação final da síntese de triacilglicerídeos nos adipócitos

(Cases et al., 1998 e Kuhn et al., 2004), que são os principais componentes da gordura de depósito, inclusive no leite. Sua atividade enzimática é controlada tanto na transcrição como na pós-transcrição da proteína (Furbass et al., 2006 e Kuhn et al., 2004). O gene *DGATI* ainda participa da regulação plasmática de gordura, concentração de triglicérides no sangue, absorção intestinal de compostos gordurosos e estocagem de gordura no tecido adiposo (Cases et al., 1998).

Muitos estudos descrevem um QTL (Quantitative Trait Loci) com grande impacto na produção de leite que está localizado na região centromérica do cromossomo 14 do bovino (Bennewitz et al., 2004, Kuhn et al., 2004 e Spelman et al., 2002).

Um QTL é uma região gênica que contribui para a variabilidade das características complexas que são influenciadas por vários genes e também pelo ambiente (Koning et al., 2006 *in* Lacorte et al., 2006).

A região do QTL pode ser formada por alguns genes, chamados de genes candidatos, que podem ser posicionais ou funcionais. Os genes candidatos posicionais podem estar em regiões codificantes ou não-codificantes e cada nucleotídeo variante se torna um candidato. Os genes candidatos funcionais têm sua função metabólica envolvida na fisiologia e desenvolvimento de alguma característica (Glazier et al., 2002). Os alelos de um QTL podem ser transmitidos, aumentando a intensidade da seleção e diminuindo o intervalo de gerações.

O sequenciamento do gene *DGATI* em bovinos revelou a presença de 19 polimorfismos dos quais, apenas um não é conservativo, sendo todos os demais localizados em íntrons ou regiões não traduzidas do gene (Winter et al., 2004).

## 1.5. VNTR

Winter et al. (2002) encontrou dois polimorfismos na região promotora do gene (início da transcrição) sendo um deles um número variável de repetições em tandem (VNTR) na posição 1465.

Em análises feitas com alguns rebanhos bovinos, foi encontrada uma sequência de 18 nucleotídeos (AGGCCCCGCCCTCCCCGG), correspondendo a um elemento de um número variável de repetições em sequência localizado na região promotora do gene, ocasionando alteração de grande influência na concentração de gordura no leite (Thaller

et al. 2003, Kuhn et al. 2004 e Winter et al., 2004) e Sousa et al., (2008) encontrou essa mesma sequência de 18 nucleotídeos em caprinos.

Na Figura 1, está representada a sequência nucleotídica do gene *DGATI* em bovinos, iniciando com o nucleotídeo de número 1141 até o 1860. As marcações mostram os primers (direto e reverse) em verde e as sequências repetitivas delimitadas em dois graus de cinza.

1141	ggatgggtgg	tgtggtgcag	gctgctgacc	actgtgtcca	gggtttctc	tcacgggccc
1201	aaggegcctc	caacctggag	tcagcccaag	gctctttcta	aatccccaaa	cccttcagc
1261	ccttcattcc	gccagcctgc	agattcctcg	tccaagaca	gatgttgctt	ccaccagggg
1321	gagattcctc	attgagcttt	cttcaacaa	ctcctcacgc	acattgtcc	ccaaaagacc
1381	ccacctatct	tgacgtttc	cctcgtgct	cttcgctgtg	accctggcag	cacctcaatc
1441	aggatccaga	ggtaccagg	ctgtaggccc	cgccctccc	ggaggccccg	ccctccccgg
1501	aggccccgcc	ctccccggag	gccccgcct	ccccggaggc	cccgcctcc	ccggaggccc
1561	cgccctgtat	caacctgga	ccccgtctc	ctaaacagg	ccccgccccg	ccttggtaca
1621	gaggcccttc	ctgattggtg	ccttcacagt	ccgtgcctc	tcattggctt	gaggccctga
1681	tcttcaact	ccagecgtgg	aaccttgg	tcctcacgt	cccgggtcag	atcggtctc
1741	tttgatgacc	ctcggcccac	cctggtgtcc	tactccagc	tgtttcatgt	tagccgaagg
1801	caaaggagcc	tggacgcgga	cacagggagc	cgcccccaac	acgtacctc	actcgtcagt

FIGURA 1: Representação do fragmento de VNTR do gene *DGATI* de *Bos taurus*, número de acesso ao GenBank AJ318490.

O gene sequenciado por Winter et al. (2004), sob o registro AJ318490 no banco de dados genéticos, possui, na região promotora do gene em questão, um VNTR com cinco sequências repetitivas, o que corresponde a um fragmento com 146 pares de bases. Estudos dos efeitos do polimorfismo nesta região, juntamente com a mutação K232A mostram um padrão dominante-recessivo (Kuhn et al., 2007).

O polimorfismo encontrado no VNTR apresenta efeitos sobre a produção de leite, conteúdo proteico, conteúdo energético e escore de células somáticas. Por ser uma região rica em CCCGCC, torna-se um local de alto potencial de ligação do fator de transcrição Sp1 (Kuhn et al., 2004, Furbass et al., 2006 e Sanders et al., 2006), que pode estar envolvido na regulação da expressão do gene. O motivo repetitivo é comum em promotores de genes indutíveis e a expressão do *DGATI* no epitélio mamário requer uma indução que é dependente do estágio de lactação (Furbass et al., 2006).

O anelamento dos primers nessa região é uma tarefa difícil, porque podem ocorrer bases variantes na sequência de nucleotídeos comprometendo a amplificação dos fragmentos sem alterar a proteína formada (Lacorte et al., 2006).

Furbass et al. (2006), encontraram cinco alelos, variando de três a sete repetições nucleotídicas. Kuhn et al. (2004 e 2007) também mencionaram cinco alelos em seus

trabalhos mas não forneceram o número de repetições dos fragmentos encontrados. Gautier et al. (2007) identificaram sete alelos com repetições de duas a oito sequências nucleotídicas, entretanto no gado holandês, que também foi utilizado neste trabalho, encontraram apenas cinco alelos com três a sete repetições. Lacorte et al. (2006) encontraram seis alelos entre raças zebuínas e taurinas, sendo o alelo 1 com apenas duas repetições. Autores como Kuhn et al. (2007), Furbass et al. (2006), Lacorte et al. (2006) e Sanders et al. (2006) encontraram correlação entre a variação dos alelos do VNTR e as características de produção.

O alelo com sete repetições é mencionado em trabalhos como de Furbass et al. (2006) e Kuhn et al. (2004 e 2007) como um polimorfismo de efeito adicional no conteúdo de gordura do leite. Isso ocorre por causa do aumento das sequências repetitivas que aumenta a região disponível para a ligação do fator de transcrição, que por sua vez estimula o gene, aumentando assim a produção de gordura no leite.

Estudos no gene *DGATI* na mutação K232A e associações são numerosas na literatura, entretanto polimorfismos na região promotora (VNTR) ainda são conflitantes, variando o número de repetições dos fragmentos encontrados pelos autores.

## 1.6. Referências

- ALFÉREZ, M.J.M.; BARRIONUEVO, M.; LÓPES ALIAGA, I. et al. Digestive utilization of goat and cow milk fat in malabsorption syndrome. **Journal of Dairy Research**, v. 68, p. 451-461, 2001.
- BENNEWITZ, J.; REINSCH, N.; PAUL, S. et al. The *DGATI* K232A mutation is not solely responsible for the milk production quantitative trait locus on the bovine chromosome 14. **American Dairy Science Association**, v. 87, n. 2, p. 431-442, 2004.
- BRITO, M. A.; GONZÁLVEZ, F. D.; RIBEIRO, L. A. et al. Composição do sangue e do leite em ovinos leiteiros do sul do Brasil: variações na gestação e na lactação. **Ciência Rural**, v. 36, n. 3, p. 942-948, 2006.
- CASES, S.; SMITH, S.J.; ZHENG, Y.W. et al. Identification of a gene encoding an acyl CoA: diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.95, p.13018-13023, 1998.
- FÜRBASS, R.; WINTER, A.; FRIES, R. et al. Alleles of the bovine *DGATI* variable number of tandem repeat associated with a milk fat QTL at chromosome 14 can stimulate gene expression. **Physiological Genomics**, v.25, p.116-120, 2006.

- GAUTIER, M.; CAPITAN, A.; FRITZ, S. et al. Characterization of the *DGATI* K232A and variable number of tandem repeat polymorphisms in French dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.90, p.2980-2988, 2007.
- GLAZIER, A.M.; NADEAU, J.H.; AITMAN, T.J. Finding genes that underlie complex traits. **Science**, v.298, p. 2345-2349, 2002.
- GRISART, B.; FARNIR, F.; KARIM, L. et al. Genetics and functional confirmation of the causality of the *DGATI* K232A quantitative trait nucleotide in affecting milk yield and composition. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.101, n.8, p.2398-2403, 2004.
- IHARA, N.; TAKASUGA, A.; MIZOSHITA, K. et al. A comprehensive genetic map of the cattle genome base don 3802 microsatellites. **Genome Research**, v.10a, p.1987-1998, 2004.
- KUHN, C.; THALLER, G.; WINTER, A. et al. Evidence for multiple alleles at the *DGATI* locus better explains a quantitative trait locus with major effect on milk fat content in cattle. **Genetics**, v.167, p.1873-1881, 2004.
- KUHN, C.; EDEL, C.; WEIKARD, R. et al. Dominance and parent-of-origin effects of coding and non-coding alleles at the acylCoA-diacylglycerol-acyltransferase (*DGATI*) gene on milk production traits in German Holstein cows. **BioMed Central Genetics**, v.8, p.62, 2007.
- LACORTE, G.A.; MACHADO, M.A.; MARTINEZ, M.L. et al. *DGATI* K232A polymorphism in Brazilian cattle breeds. **Genetics and Molecular Research**. v.5, p.475-482, 2006.
- LEHNER, R. AND A. KUKSIS, A. Biosynthesis of triacylglycerols. **Prog. Lipid. Res.**, v.35, n.2, p.169-201, 1996.
- MENEZES, M.P.C.; MARTINEZ, A.M.; RIBEIRO, M.N. et al. Caracterização genética de raças caprinas nativas brasileiras, utilizando-se 27 marcadores microssatélites. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.4, p.1336-1341, 2006.
- MIORANZA, A. **Análise de polimorfismo do gene *DGATI* em caprinos**. Trabalho de conclusão de curso – Ciências Biológicas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel. 2006.
- NUDDA, A.; BENCINI, R.; MIJATOVIC, S. et al. The yield and composition of milk in Sarda, Awassi, and Merino Sheep milked unilaterally at different frequencies. **Journal of Dairy Science**, v.85, p.2879–2884, 2002.
- OLIVEIRA, M.A.; REIS, R.B.; LADEIRA, M.M. et al. Produção e composição do leite de vacas alimentadas com dietas com diferentes proporções de forragem e teores de lipídeos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.3, p.759-766, 2007.

- PERES, J. R. O leite como ferramenta do monitoramento nutricional. **Uso do leite para monitorar o a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras**. Porto Alegre, p.30-45, 2001. Disponível em: <[http://www6.ufrgs.br/bioquimica/extensao/anais\\_2001.pdf#page=30](http://www6.ufrgs.br/bioquimica/extensao/anais_2001.pdf#page=30)>. Acesso em: Abril de 2008.
- RIQUET, J.; COPPIETERS, W.; CAMBISANO, N. et al. Fine-mapping of quantitative trait loci by identity by descent in outbred populations: Application to milk production in dairy cattle. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.96, n.16, p.9252-9257, 1999.
- SANDERS, K.; BENNEWITZ, J.; REINSCH, N. et al. Characterization of the *DGATI* mutations and the CSN1S1 promoter in the German Angeln dairy cattle population. **Journal of Dairy Science**, v.89, p.3164-3174, 2006.
- SHENNAN, D.B.; PEAKER, M. Transport of milk constituents by the mammary gland. **Physiol Rev**. v.80, p.925-951, 2000.
- SOUSA, A.C.; SOARES, M.A.S.; RODRIGUES, M.T. Análises preliminares da região promotora do gene *DGATI* em caprinos leiteiros. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre. v.6, p.55-56, 2008.
- SPELMAN, R.J.; FORD, C.A.; MCELHINNEY, P. et al. Characterization of the *DGATI* gene in the New Zealand dairy population. **Journal of Dairy Science**, v.85, p.3514-3517, 2002.
- THALLER, G.; KÜHN, C.; WINTER, A. et al. *DGATI*, a new positional and functional candidate gene for intramuscular fat deposition in cattle. **Animal Genetics**, v.34, p.354-357, 2003.
- THALLER, G.; KRÄMER, W.; WINTER, A. et al. Effects of *DGATI* variants on milk production traits in German cattle breeds. **Journal of Animal Science**. v.81, p.1911-1918, 2003.
- WINTER, A.; KRÄMER, W.; WERNER, F.A. et al. Association of a lysine-232-alanine polymorphism in a bovine gene encoding acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase (*DGATI*) with variation at a quantitative trait locus for milk fat content. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.99, p.9300-9305, 2002.
- WINTER, A.; ALZINGER, A.; FRIES, R. Assessment of the gene content of the chromosomal regions flanking bovine *DGATI*. **Genomics**, v.83, p.172-180, 2004.

## II. OBJETIVOS GERAIS

Com este trabalho objetivou-se avaliar a frequência gênica e genotípica do gene *DGATI* quanto à variação de VNTR em uma população de gado holandês e avaliar a presença desse polimorfismo em caprinos e ovinos.

### III. FREQUÊNCIA GÊNICA E GENOTÍPICA DO VNTR DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *DGATI* EM BOVINOS LEITEIROS

**Resumo:** O gene *DGATI* é um gene candidato envolvido com o conteúdo de gordura no leite e em razão de sua função fisiológica, esse gene é de grande interesse para os criadores de rebanhos leiteiros. Esse gene possui uma região com VNTR com poucas informações, mas sugere que o polimorfismo nesta região possa estar relacionado à variação na produção. Neste estudo foram analisadas amostras de DNA de 72 bovinos leiteiros através de amostras de sangue retiradas da veia caudal dos animais. A frequência genotípica e gênica para o polimorfismo VNTR do gene *DGATI* foram obtidas diretamente após amplificação por PCR. Foram encontrados quatro alelos, presentes em homozigose e heterozigose, cujas frequências foram: alelo 1 (com três repetições) de 4%, alelo 2 (com quatro repetições) de 50%, alelo 3 (com cinco repetições) de 40% e alelo 4 (com seis repetições) de 6%. Foi verificado o equilíbrio de Hardy-Weinberg através do teste de Qui-quadrado concluindo que a população não se encontrava em equilíbrio. Encontraram-se oito genótipos em que os mais frequentes foram  $A_2A_2$  (44%) e  $A_3A_3$  (32%).

**Palavras-chave:** diacilglicerol aciltransferase 1, polimorfismo, síntese de gordura

GENE AND GENOTYPE FREQUENCIES OF VNTR IN THE PROMOTER REGION  
OF GENE *DGATI* IN DAIRY CATTLE

**Abstract:** The *DGATI* gene is a candidate gene involved in fat content in milk and due to its physiological function, this gene is very interesting to dairy cattle breeders. This gene presents a VNTR region with little information, but it suggests that the polymorphism in this region may be related to variations in production. This study analyzed DNA samples from 72 dairy cattle using blood samples taken from the tail vein of animals. The genotype and gene frequency of VNTR polymorphism in the *DGATI* gene was obtained directly after PCR amplification. It was found four alleles present in homozygous and heterozygous, whose frequencies were: allele 1 (with three repetitions) of 4%, allele 2 (with four repetitions) of 50%, allele 3 (with five repetitions) of 40% and allele 4 (with six repetitions) of 6%. It was verified the Hardy-Weinberg equilibrium by Chi-square test and concluding that the population was not in balance. It was found eight genotypes where the highest frequency was for genotypes  $A_2A_2$  (44%) and  $A_3A_3$  (32%).

**Key words:** Diacylglycerol acyltransferase 1, polymorphism, synthesis of fat

## Introdução

O uso de seleção fenotípica em longo prazo pode alterar a frequência gênica, afetando um ou mais caracteres, resultando, além da resposta direta no caractere selecionado, também em respostas em muitos outros caracteres correlacionadas. Em virtude do desenvolvimento da biologia molecular, tornou-se possível o estudo mais detalhado de genes envolvidos com características quantitativas, como a produção de leite. Este complexo fluido biológico constitui-se em um alimento completo para mamíferos neonatos. Sua composição varia entre as espécies e dentro da mesma espécie, dependendo do estágio de lactação, alimentação, estação do ano e genética.

Muitos genes que apresentam polimorfismos conhecidos e com aplicações confirmadas já foram descritos e alguns patenteados, sendo que muitos genes polimórficos apresentam interesse econômico, dentre eles, o gene *DGATI* que codifica a enzima diacilglicerol aciltransferase 1, enzima que catalisa a reação final da síntese de triacilglicerídeos nos adipócitos (Cases et al., 1998). Sua atividade enzimática é controlada tanto na transcrição como na pós-transcrição da proteína (Furbass et al., 2006 e Kuhn et al., 2004).

O *DGATI* tornou-se um gene candidato funcional e posicional para o conteúdo de gordura no leite, baseado, respectivamente, no fenótipo de ausência de lactação observada em camundongos deficientes do gene e por causa de sua posição próxima a um QTL identificado no cromossomo 14 de bovinos (Riquet et al., 1999). Um QTL (Quantitative Trait Loci) é uma região gênica que contribui para a variabilidade das características complexas que são influenciadas por vários genes e também pelo ambiente (Koning et al., 2006 in Lacorte et al., 2006). Na última década grandes esforços têm sido empregados para a construção dos mapas físico e genéticos do genoma bovino que atualmente contam com mais de 4.000 marcadores, em sua maioria, marcadores microssatélites, SNPs (single nucleotide polymorphism) e também ESTs (expressed sequence tags) (Ihara et al., 2004).

O *DGATI* bovino tem aproximadamente 8,6 Kb e compreende 17 éxons, medindo em média 121,8 pares de base e a conformação dos íntrons é estritamente conservada entre humanos e bovinos (Grisart et al., 2004). O gene codifica uma enzima formada por 489 aminoácidos, envolvida na biossíntese de triglicerídeos, que se expressa em muitos tecidos, com os mais altos níveis de expressão no intestino, testículo, tecido adiposo, glândulas mamárias e tecido epitelial (Cases et al., 1998).

O sequenciamento do gene *DGATI* em bovinos revelou a presença de 19 polimorfismos dos quais, apenas um não é conservativo, sendo todos os demais localizados em íntrons ou regiões não traduzidas do gene (Winter et al., 2004). Entretanto, estudos sugerem a presença de mais de dois alelos afetando características de produção de leite no loco do *DGATI* (Kuhn et al., 2007). Winter et al. (2002) encontraram dois polimorfismos na região 5' do gene, sendo um deles representado por repetições de número variável tandem (VNTR) na posição 1465.

Em análise feita com rebanhos bovinos, foi encontrada uma sequência de 18 nucleotídeos (AGGCCCGCCCTCCCCGG), correspondendo a um elemento de um número variável de repetições em sequência localizado na região promotora do gene, ocasionando alteração de grande influência na concentração de gordura no leite (Thaller et al. 2003, Kuhn et al., 2004 e Winter et al., 2004).

O polimorfismo encontrado no VNTR apresenta efeitos sobre a produção de leite, conteúdo proteico, conteúdo energético e escore de células somáticas. Por ser uma região rica em CCCGCC, torna-se um local de alto potencial de ligação do fator de transcrição Sp1 (Kuhn et al., 2004, Furbass et al., 2006 e Sanders et al., 2006), que pode estar envolvido na regulação da expressão do gene. O motivo repetitivo é comum em promotores de genes indutíveis e a expressão do *DGATI* no epitélio mamário requer uma indução que é dependente do estágio de lactação (Furbass et al., 2006).

O objetivo deste trabalho foi determinar a frequência gênica e genotípica de uma população de bovinos leiteiros em relação ao gene *DGATI* e avaliar a presença de polimorfismos de VNTR na região promotora do gene.

## **Material e Métodos**

Foram avaliados os genótipos de 72 vacas de produção leiteira provenientes da Estância das Cascatas, localizada no município de Tamarana, Paraná. Entre os animais, foram avaliadas as raças e o grau de sangue do rebanho, sendo 44,44% dos animais Holandeses PO e 30,56% 31/32 Holandeses. Apenas 1,39% eram mistos Holandês/Pardo Suíço, 1,39% Jersey e 2,78% Gir.

O material genético foi extraído de amostras de sangue retiradas da veia caudal dos animais. Essas amostras foram armazenadas com adição de EDTA e congeladas por seis meses. Coelho et al. (2004), mostraram em estudos com diversos materiais biológicos que o congelamento e tempo de estocagem não alteram a quantidade do DNA genômico.

Após a retirada do excesso de hemoglobina das amostras centrifugadas, procedeu-se a purificação de DNA com CTAB (Brometo cetil trimetilamônio) e proteinase K (20 mg/mL). O material permaneceu em banho-maria a 55°C por 1 hora, e então foi adicionado 500 µL de clorofórmio e álcool isoamílico numa proporção de 24:1, e levado a centrífuga em 10.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e uma nova lavagem com clorofórmio e álcool isoamílico foi feita nas mesmas condições anteriores. Novamente, o sobrenadante foi transferido e, então, adicionado ao tubo, 350 µL de isopropanol gelado, onde se observa a formação dos pellets de DNA. Após a refrigeração mínima de 30 minutos, o tubo foi centrifugado a 12.000 rpm por 20 minutos e o sobrenadante foi vertido, verificando a presença do pellet no fundo do tubo. O DNA foi lavado três vezes em 1.000 µL de etanol 75% gelado centrifugado a 12.000 rpm por 2 minutos, e depois de seco, foi ressuscitado em água ultra pura.

O material foi quantificado através de espectrofotômetro no comprimento de onda de 260 nm e padronizado para 50 ng/µL de DNA. A integridade do DNA foi avaliada em gel de agarose 1%, com coloração de brometo de etídeo (0,5 µg/mL) e visualização em transluminador com luz ultravioleta.

Utilizando os primers descritos por Kuhn et al. (2004), (*DGAT1* F: 5'-TCAGGATCCAGAGGTACCAG-3' e R: 5'-GGGGTCCAAGGTTGATACAG-3'), o fragmento esperado, após a amplificação, era de 146 pares de bases, que corresponde ao alelo com cinco repetições e é normalmente encontrado em todos os trabalhos realizados com este gene. As repetições estão localizadas a partir da base na posição 1465 da região promotora do gene do *DGAT1*, com número de acesso ao GenBank AJ318490 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

A reação de PCR foi feita para um volume final de 10 µL, contendo as concentrações de 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTP, 5 µL de cada primer (com solução de uso a 10 pmol), 0,2 unidades de *Taq* DNA Polimerase e 50 ng/µL de DNA genômico.

O programa de desnaturação inicial foi de 94°C por 5 minutos, e 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento dos primers em 60°C por 20 segundos e extensão da *Taq* em 72°C por 12 segundos, seguido por uma extensão final de 72°C por 2 minutos.

A visualização foi feita em gel de poliacrilamida 12% com eletroforese conduzida a 120 V por 6 horas, utilizando tampão de corrida TBE. A coloração foi feita com nitrato de prata em concentração de 12% e hidróxido de sódio a 18%.

Os alelos encontrados foram classificados de 1 ( $A_1$ ) a 4 ( $A_4$ ), de acordo com o número de repetições dos nucleotídeos sendo o alelo  $A_1$  com menor número de repetições (três repetições) e o alelo  $A_4$ , com o maior (seis repetições).

Foi realizada a determinação da frequência genotípica esperada e observada, frequência gênica, heterozigozidade esperada e observada e também foi medido o equilíbrio de Hardy-Weinberg através do teste de Qui-quadrado, em um nível de significância de 5%, utilizando o programa POPGENE 1.31 (Yeh et al., 1999).

### Resultado e Discussão

O polimorfismo da região de VNTR está localizado na região promotora do gene *DGATI* (não traduzida), que torna o anelamento dos primers uma tarefa difícil, pois podem ocorrer bases variantes em regiões não conservadas na sequência de nucleotídeos comprometendo a amplificação dos fragmentos (Lacorte et al., 2006), o que pode explicar porque Sanders et al. (2006) não conseguiram amplificar a região com os mesmos primers utilizados neste trabalho.

Analisando os géis de poliacrilamida após a migração dos fragmentos, foi possível identificar apenas quatro alelos, variando de três a seis repetições de nucleotídeos. Na Tabela 1, encontra-se o tamanho dos fragmentos de cada alelo.

TABELA 1: Tamanho dos fragmentos encontrados em cada alelo da região de VNTR do gene *DGATI* em bovinos leiteiros.

Alelo	Número de repetições	Fragmentos
$A_1$	3	110 pb
$A_2$	4	128 pb
$A_3$	5	146 pb
$A_4$	6	164 pb
$A_5$	7	182 pb

Legenda: pb= pares de base

Furbass et al. (2006), encontraram cinco alelos, variando de três a sete repetições nucleotídicas. Kuhn et al. (2004 e 2007) também mencionaram cinco alelos em seus trabalhos mas não forneceu o número de repetições dos fragmentos encontrados. Gautier et al. (2007) identificaram sete alelos com repetições de duas a oito sequências nucleotídicas, entretanto no gado holandês que também foi utilizado neste trabalho,

encontraram apenas cinco alelos com três a sete repetições. Lacorte et al. (2006) encontraram seis alelos entre raças zebuínas e taurinas, sendo o alelo 1 com apenas duas repetições.

A frequência alélica mostrou que o alelo  $A_1$  está presente em 4,17% da população, o alelo  $A_2$  em 50%, o alelo  $A_3$  em 39,58% e o alelo  $A_4$  em 6,25% da população avaliada. Diante desses valores, esperava-se encontrar um maior número de heterozigotos para o alelo 2 e 3, o que não ocorreu como pode ser observado na Tabela 2, que mostra a frequência genotípica da população.

Sanders et al. (2006) com uma amostragem de *Bos taurus* pertencentes a cinco famílias distintas, encontraram o alelo E com frequência igual a 38%, seguido pelos alelos C com 30%, e alelo B com 25%. Os autores observaram que o alelo E apresentou efeito significativo para algumas características de produção de leite, como queda nos teores de lactose e aumento de células somáticas no leite, quando comparado com todos os outros alelos de VNTR do promotor do *DGATI*. Com relação à produção de leite em kg, a presença do alelo E não promoveu mudanças significativas. Resultados semelhantes foram relatados por Kuhn et al. (2004) que também encontraram o alelo de sete repetições, denominado de VNTR5. Esse alelo corresponde ao alelo E descrito por Sanders et al. (2006), e também ao alelo de sete repetições (alelo 6) apresentado em Lacorte et al. (2006). Tal alelo não foi encontrado no presente trabalho.

O alelo  $A_5$  com sete repetições é mencionado em outros trabalhos como de Furbass et al. (2006) e Kuhn et al. (2007 e 2004) como um polimorfismo de efeito adicional no conteúdo de gordura do leite.

Lacorte et al. (2006) estudando o mesmo polimorfismo de VNTR do gene *DGATI* descreveu um alelo com duas repetições para as raças nelore e guzerá (*Bos indicus*), e não observou a presença do mesmo em raças taurinas (*Bos taurus*), o que poderia explicar a não aparição do alelo com duas repetições nas amostras avaliadas neste trabalho que envolveu principalmente animais holandeses puros ou de alto grau de sangue *Bos taurus*. Os alelos mais frequentes encontrados pelos autores citados foram os de quatro, cinco e seis repetições, correspondentes aos alelos  $A_2$ ,  $A_3$  e  $A_4$  que também foram os mais frequentes no presente trabalho.

Kuhn et al. (2007) sugerem um efeito no loco *DGATI* com origem nos pais, com diferença na herança paterna e materna sobre a região promotora VNTR e a mutação K232A, ou seja, pai e mãe influenciam diferentemente sobre o polimorfismo do gene *DGATI*.

O valor encontrado no teste de Qui-quadrado para o equilíbrio de Hardy-Weinberg foi de 87,24 ( $p < 0,05$ ), demonstrando que a população não se encontra em equilíbrio. Nas condições de seleção é natural que o equilíbrio não seja verificado, uma vez que o equilíbrio é atingido e mantido, quando a população é grande e os acasalamentos ocorrem ao acaso, condições que não se observa em populações de bovinos que estão sob melhoramento genético.

Foram encontrados oito genótipos na população, em que os genótipos  $A_2A_2$  e  $A_3A_3$  foram mais frequentes. Esses valores são confirmados pela análise de heterozigosidade, que mostrou que a heterozigosidade esperada era de 59,18% e foi observada apenas 19,44%. Isso pode ser devido a pré seleção do rebanho para a produção de leite, pois selecionando os pais pelo fenótipo, pode ter ocorrido diminuição na diversidade genética, limitando a variabilidade dos cruzamentos.

A heterozigosidade encontrada concorda com os valores encontrados por Lacorte et al. (2006), que apesar de terem observado valores relativamente altos de heterozigosidade para amostras da espécie *Bos indicus*, encontraram valores significativos de deficiência de heterozigotos em *Bos taurus*, especificamente para o locos VNTR e K232A *DGATI* na raça holandesa, que apoiam a ideia de endogamia na população brasileira.

Autores como Kuhn et al. (2007), Furbass et al. (2006), Lacorte et al. (2006) e Sanders et al. (2006), encontraram correlação entre a variação dos alelos do VNTR e as características de produção, que não pôde ser confirmada neste trabalho. Mesmo assim, pôde-se verificar polimorfismo da região promotora na população analisada.

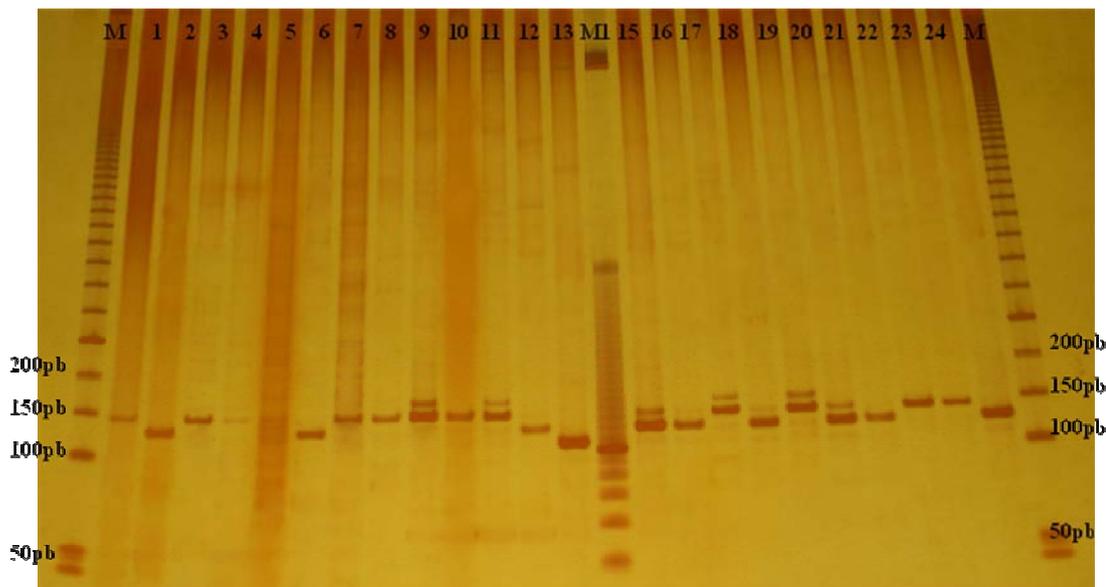


FIGURA 1: Gel de poliacrilamida 12%. Canaletas: M- marcador de peso molecular de 50 pares de bases (pb); M1: marcador de 10 pares de base; 13-  $A_1A_1$ ; 2, 6, 12, 16, 18, 21 e 24-  $A_2A_2$ ; 15 e 20-  $A_2A_3$ ; 1, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 22 e 23-  $A_3A_3$ ; 9, 11, 17 e 19-  $A_3A_4$ .

Na Figura 1, verifica-se a presença de indivíduos homocigotos e heterocigotos para os quatro alelos identificados. A canaleta 13 mostra um indivíduo  $A_1A_1$ , fragmento de 110 pb com três repetições correspondendo a um indivíduo homocigoto para o alelo 1. A canaleta 15 mostra um indivíduo  $A_2A_3$ , com um fragmento de 146 pb e outro com 128 pb, formando um heterocigoto para o alelo 2 e 3. Na canaleta 16 encontra-se o genótipo de um homocigoto  $A_2A_2$  e na 17, um heterocigoto  $A_3A_4$ .

Na Tabela 2, estão relacionadas as frequências genotípica observada e esperada na população em estudo.

TABELA 2: Frequência genotípica observada e esperada da população amostrada considerando a região promotora do gene *DGATI*.

Genótipos	Freq. Observada	Freq. Esperada	Freq. Observada (%)
$A_1A_1$	2	0,11	2,78
$A_1A_2$	2	3,02	2,78
$A_1A_3$	0	2,39	0
$A_1A_4$	0	0,38	0
$A_2A_2$	32	17,87	44,44
$A_2A_3$	5	28,70	6,94
$A_2A_4$	1	4,53	1,39
$A_3A_3$	23	11,16	31,94
$A_3A_4$	6	3,59	8,33
$A_4A_4$	1	0,25	1,39

### **Conclusões**

A região promotora do gene *DGATI*, em que se localiza uma região de variações com repetições em sequência (VNTR), mostrou-se polimórfica com presença de quatro alelos encontrados em homozigose e heterozigose na população de bovinos leiteiros. Foram verificados oito genótipos na população sendo os mais frequentes  $A_2A_2$  (44%) e  $A_3A_3$  (32%).

## Referências

- CASES, S.; SMITH, S.J.; ZHENG, Y.W. et al. Identification of a gene encoding an acyl CoA: diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.95, p.13018-13023, 1998.
- COELHO, E.G.A., OLIVEIRA, D.A.A., TEIXEIRA, C.S. et al. Comparação entre métodos de estocagem de DNA extraído de amostras de sangue, sêmen e pêlos e entre técnicas de extração. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, n.1, p.111-115. 2004.
- FÜRBASS, R.; WINTER, A.; FRIES, R. et al. Alleles of the bovine *DGATI* variable number of tandem repeat associated with a milk fat QTL at chromosome 14 can stimulate gene expression. **Physiological Genomics**, v.25, p.116-120, 2006.
- GAUTIER, M.; CAPITAN, A.; FRITZ, S. et al. Characterization of the *DGATI* K232A and variable number of tandem repeat polymorphisms in French dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.90, p.2980-2988, 2007.
- GRISART, B.; FARNIR, F.; KARIM, L. et al. Genetics and functional confirmation of the causality of the *DGATI* K232A quantitative trait nucleotide in affecting milk yield and composition. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.101, n.8, p.2398-2403, 2004.
- IHARA, N.; TAKASUGA, A.; MIZOSHITA, K. et al. A comprehensive genetic map of the cattle genome base don 3802 microsatellites. **Genome Research**, v.10a, p.1987-1998, 2004.
- KUHN, C.; THALLER, G.; WINTER, A. et al. Evidence for multiple alleles at the *DGATI* locus better explains a quantitative trait locus with major effect on milk fat content in cattle. **Genetics**, v.167, p.1873-1881, 2004.
- KUHN, C.; EDEL, C.; WEIKARD, R. et al. Dominance and parent-of-origin effects of coding and non-coding alleles at the acylCoA-diacylglycerol-acyltransferase (*DGATI*) gene on milk production traits in German Holstein cows. **BioMed Central Genetics**, v.8, p.62, 2007.
- LACORTE, G.A.; MACHADO, M.A.; MARTINEZ, M.L. et al. *DGATI* K232A polymorphism in Brazilian cattle breeds. **Genetics and Molecular Research**, v.5, p.475-482, 2006.
- RIQUET, J.; COPPIETERS, W.; CAMBISANO, N. et al. Fine-mapping of quantitative trait loci by identity by descent in outbred populations: Application to milk production in dairy cattle. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.96, n.16, p.9252-9257, 1999.
- SANDERS, K.; BENNEWITZ, J.; REINSCH, N. et al. Characterization of the *DGATI* mutations and the CSN1S1 promoter in the German Angeln dairy cattle population. **Journal of Dairy Science**, v.89, p.3164-3174, 2006.

- SOUSA, A.C.; SOARES, M.A.S.; RODRIGUES, M.T. Análises preliminares da região promotora do gene *DGATI* em caprinos leiteiros. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre. v.6, p.55-56, 2008.
- THALLER, G.; KRÄMER, W.; WINTER, A. et al. Effects of *DGATI* variants on milk production traits in German cattle breeds. **Journal of Animal Science**, v.81, p.1911-1918, 2003.
- WINTER, A.; KRÄMER, W.; WERNER, F.A. et al. Association of a lysine-232-alanine polymorphism in a bovine gene encoding acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase (*DGATI*) with variation at a quantitative trait locus for milk fat content. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.99, p.9300-9305, 2002.
- WINTER, A.; ALZINGER, A.; FRIES, R. Assessment of the gene content of the chromosomal regions flanking bovine *DGATI*. **Genomics**, v.83, p.172-180, 2004.
- YEH, F.C.; BOYLE, T.Y.Z. and XIYAN, J.M. [1999] **POPGENE version 1.31**. University of Alberta and Center for International Forestry Research. Disponível em: <<http://www.ualberta.ca/~fyeh>>. Acesso: maio de 2009.

#### IV. POLIMORFISMO DE VNTR DO GENE *DGATI* EM BOVINOS, CAPRINOS E OVINOS

**Resumo:** O gene *DGATI* tem mostrado influência sobre a produção de leite e seus componentes lipídicos. Entretanto, a maior parte dos estudos é feita em bovinos em razão de sua produção leiteira ser mais representativa no mercado. Neste trabalho, utilizando-se de primers previamente desenhados para a espécie bovina, foi testada a amplificação do VNTR da região promotora do gene *DGATI* em bovinos, caprinos e ovinos. A extração do DNA genômico foi feita a partir de amostras de sangue. Os primers desenhados se mostraram pouco eficientes, apesar de amplificar na região esperada com fragmentos entre 700 e 800 pares de base nas três espécies, por causa da alta variação nucleotídica na região de anelamento dos primers. Foi encontrado um polimorfismo de VNTR na região promotora do gene *DGATI* nas raças Alpina e Saanen, com presença de um indivíduo heterozigoto.

**Palavras-chave:** região promotora, diacilglicerol aciltransferase, conteúdo lipídico do leite

VNTR POLYMORPHISM IN *DGATI* GENE IN CATTLE, GOATS AND SHEEP

**Abstract:** The *DGATI* gene has been shown to influence the milk production and its lipid components. However, most studies are done in bovines because of their milk production to be more representative in the market. In this work, using primers designed previously for the bovine species, it was tested the amplification of VNTR of the promoter region of the gene *DGATI* in cattle, goats and sheep. The extraction of genomic DNA was made from blood samples. The primers designed were not efficient, although the region expected amplified with fragments between 700 and 800 base pairs in the three species due to the high nucleotide variation in the region of annealing of primers. It was found a VNTR polymorphism in the promoter region of the *DGATI* gene in Alpine and Saanen breeds, with the presence of a heterozygous individual.

**Key words:** promoter region, diacylglycerol acyltransferase, lipid content of milk

## Introdução

O leite é um fluído biológico com função de suprir as necessidades nutricionais de mamíferos neonatos, proporcionando várias vantagens fisiológicas por meio de suas proteínas e políptídeos. Ele é rico em enzimas, inibidores enzimáticos, imunoglobulinas, fatores de crescimento e agentes antimicrobianos que tendem a oscilar de acordo com as estações do ano, alimentação do animal, raça e estágio de lactação (Antunes, 2003).

Através das descobertas científicas, foi possível desvendar os processos bioquímicos envolvidos na síntese do leite, estabelecendo-se o papel dos hormônios no desenvolvimento da glândula mamária e regulamento de sua função (Bauman et al., 2006).

A criação de ovinos, em maioria é destinada a produção de carne ou produção de lã. Entretanto, sendo o leite um produto de alta qualidade, costuma ser utilizado pela indústria de queijos e pouco é consumido por humanos “in natura” (Bencini e Pulina, 1997).

Na maioria das espécies, a lactose é o componente mais estável do leite, que por sua vez, é pouco influenciado por fatores ambientais (Brito et al., 2006). Entretanto, os demais componentes sofrem interferência de fatores genéticos, ambientais, biológicos, período de lactação, raça, idade e nível nutricional que influencia na qualidade, composição química e nas propriedades do leite.

Em caprinos, os glóbulos de gordura liberados pelas células epiteliais da glândula mamária são de menor tamanho comparados aos da vaca, e isso ocorre pela maior quantidade de triglicerídeos de cadeia média (Alfárez et al., 2001).

A gordura é o principal componente energético do leite, composta de ácidos graxos de variados comprimentos de cadeia e grau de saturação. É o componente do leite que possui a maior taxa de variação, podendo oscilar entre 2 e 3 pontos percentuais (Peres, 2001).

O *DGATI* codifica a enzima que participa da última etapa da formação dos triglicerídeos, que são carregados para o leite e depósitos de gordura do organismo. O gene *DGATI* ainda participa da regulação plasmática de gordura, concentração de triglicerídeos no sangue, absorção intestinal de compostos gordurosos e estocagem de gordura no tecido adiposo (Cases et al., 1998).

A análise da sequência nucleotídica do gene *DGATI* em bovinos detectou 19 polimorfismos, sendo dois causados por um número variável de repetições em

sequência (VNTR) e outros 17 resultantes de substituições nucleotídicas (Winter et al., 2002), inclusive a mutação mais estudada K232A.

De acordo com Thaller et al. (2003), existem sequências de VNTR que podem alterar a eficiência das proteínas devido a modificações em sua estrutura. Há ainda relatos de que o VNTR, constituído de 18 nucleotídeos, desempenha funções na transcrição, estabilidade do mRNA e na tradução das proteínas do leite (Kuhn et al., 2004).

## Material e Métodos

Para a avaliação do polimorfismo na região de VNTR foram utilizadas três espécies de mamíferos: *Capra hircus* (cabra), *Bos taurus* (vaca) e *Ovis aries* (ovelha). O lote caprino foi composto de 35 animais entre eles da raça Bôer, Saanen e Alpina, o lote bovino com cinco animais mestiços Jersey e Holandês e o ovino com cinco ovelhas da raça Santa Inês.

Para a amostragem foi coletado cerca de 10 mL de sangue periférico em tubos estéreis com Ácido Etilenodiamino Tetra-acético (EDTA) a 8%, de todos os animais das diferentes espécies. O sangue das raças caprinas foi centrifugado a 2.000 rpm, já o sangue dos bovinos e ovinos foi deixado em repouso para coleta da camada de leucócitos, depositada entre os eritrócitos e o plasma.

Os oligonucleotídeos (primers) foram desenhados com base na sequência bovina disponível no *GenBank* (nº de acesso AJ318490) e utilizados nas três espécies trabalhadas. As sequências dos oligonucleotídeos foram: *DGATI* F- (5' ACAGTGGGCTCCGTGCTG 3') e R- (5' ATGAAACAGCTGGAGTGAGGAC 3').

A extração de DNA do sangue seguiu o protocolo desenvolvido por Muhammad et al. (1994) com modificações. A amostra foi submetida à centrifugação a 2.000 rpm a fim de separar os leucócitos dos demais componentes do sangue. Para isolar o DNA genômico, utilizou-se 100 µL de leucócitos adicionados a 500 µL do tampão de extração (100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1,4 M NaCl; 2M EDTA; 2% Brometo de hexadecil-trimetilamonio (CTAB), 0,2% b-mercaptoetanol) em tubos de 1,5 mL, mantidos por duas horas em banho-maria a 60°C com agitações ocasionais.

Foi adicionado ao tubo, 500 µL de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1) acompanhado por agitação vigorosa e em seguida foram submetidos à centrifugação em 12.000 rpm por 15 minutos para divisão das fases, em que o sobrenadante (fase aquosa)

foi transferido para tubos estéreis. Em seguida foi adicionado 250  $\mu\text{L}$  de isopropanol, que precipita o DNA genômico, deixado sob refrigeração de 4° C por 30 minutos e então os tubos foram centrifugados a 12.000 rpm por 2 minutos. O procedimento levou a formação do pellet que foi lavado por três vezes em etanol a 75%.

Como etapa final, após a evaporação de restos de etanol, o DNA foi hidratado com aproximadamente 50  $\mu\text{L}$  de água ultra pura, homogeneizado e levado para o armazenamento a -20° C.

A amplificação dos fragmentos das três espécies foi realizada pela técnica de PCR. Foi preparado um Mix, contendo o par de primers, DNA genômico, *Taq* DNA polimerase, dNTPs,  $\text{MgCl}_2$ , Tris HCl, KCl, e água ultra pura. Ao final, cada tubo de reação continha um volume de 20  $\mu\text{L}$ .

Os fragmentos de interesse foram amplificados através de um programa cíclico de diferenciação de temperatura com 35 repetições, constando de desnaturação da fita molde a 94°C por 1 minuto, anelamento dos oligonucleotídeos a 67°C por 45 segundos e síntese do fragmento pela *Taq* DNA polimerase a 72°C por 1 minuto. Estas condições foram as mesmas para as três espécies analisadas.

O material amplificado pela técnica de PCR foi misturado com corante e tampão de corrida (TBE 1X), e então realizada corrida de eletroforese em gel de poliacrilamida 5%, primeiramente verificando se ocorreu realmente a amplificação do fragmento. Os fragmentos adequadamente amplificados foram submetidos à nova corrida eletroforética em gel de poliacrilamida 12% a uma velocidade de 65 Watts por 18 horas. Após a corrida, os géis foram corados por nitrato de prata e desidratado para fotodocumentação.

## **Resultados e Discussões**

Os fragmentos amplificados apresentaram tamanhos de aproximadamente 700 pares de base, pois o desenho dos primers foi feito baseado na sequência de nucleotídeos bovina, em que é esperado um fragmento de 777 pares de base.

Os primers utilizados se mostraram com baixa eficiência nas três espécies analisadas, pois todas obtiveram pouco sucesso nas amplificações na região esperada. Através de uma corrida eletroforética lenta em gel de poliacrilamida concentrado a 12%, o distanciamento das bandas fica evidenciado, podendo-se verificar as diferenças de tamanho entre as três espécies, como mostra a Figura 1.

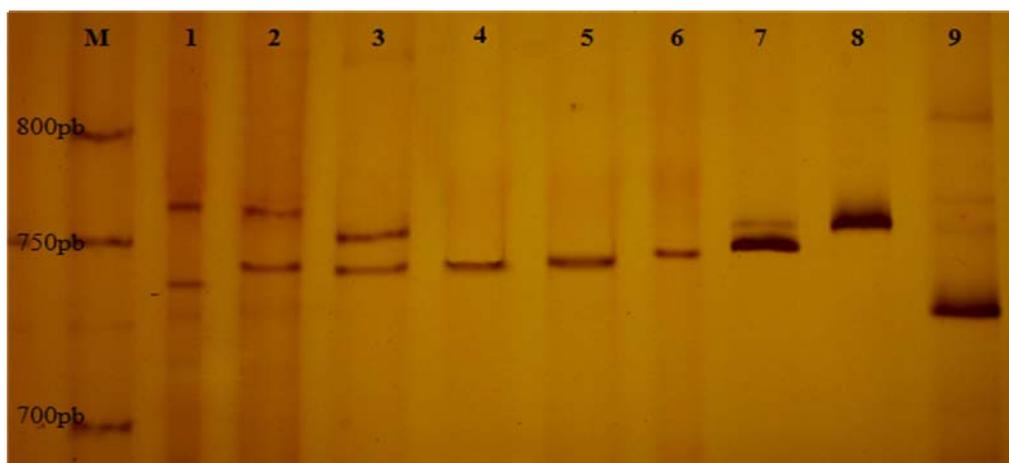


FIGURA 1: Polimorfismo na região promotora em gel de poliacrilamida comparando as espécies bovina, ovina e caprina. Canaletas: M- marcador de peso molecular de 50 pb; 1, 2 e 3- amostra bovina; 4, 5 e 6- amostra ovina; 7, 8 e 9- amostra caprina.

As bandas formadas pela amplificação da região promotora do *DGATI* em ovinos (canaletas 4, 5 e 6) parecem ser mais constante em relação ao tamanho do fragmento, o que não ocorre em caprinos e bovinos, em que as variações são mais evidentes. Em uma população de caprinos estudada por Sousa et al. (2008) ao utilizar enzimas de restrição na região promotora do gene *DGATI* verificou a existência de VNTR, porém sem detectar polimorfismo nas repetições.

Comparando então as três raças de caprinos disponíveis, é possível verificar a presença de polimorfismo nos fragmentos, inclusive a presença de um indivíduo heterozigoto. Na Figura 2, observam-se em sequência, as amostras dos caprinos das raças Alpina, Saanen e Bôer.

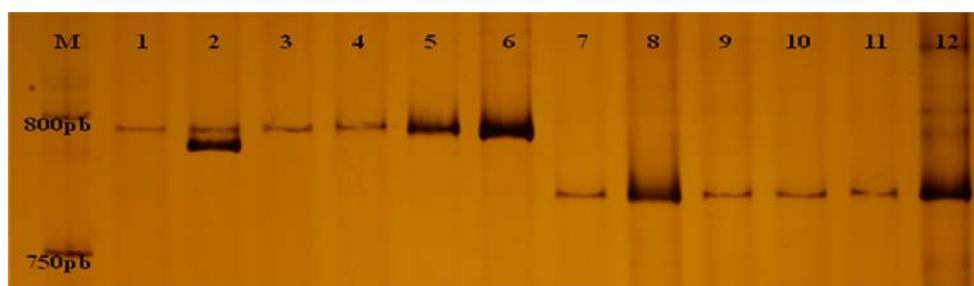


FIGURA 2: Polimorfismo da região promotora do gene *DGATI* em caprinos. Canaletas: M- marcador de peso molecular de 50 pb; 1, 2, 3 e 4- raça Alpina; 5, 6, 7 e 8- raça Saanen; 9, 10, 11 e 12- raça Bôer.

Analisando os animais por raça, foi possível identificar a presença de um indivíduo heterozigoto para o mesmo loco entre os animais da raça Alpina. Já na raça

Saanen, verificou-se a presença de dois alelos em homozigose, e na raça Bôer, os indivíduos mostraram-se similares.

Em bovinos, também foi observado uma variação no tamanho dos fragmentos, que concorda com Winter et al. (2002) que trabalharam com animais da raça holandesa, encontrando diferentes tamanhos de fragmentos na mesma espécie.

Thaller et al.(2003), Kuhn et al. (2004) e Winter et al. (2004) evidenciaram que a variação do número de repetições (VNTR) em bovinos era de 18 nucleotídeos. Essa variação também pode ser estabelecida para os caprinos, que na raça Saanen mostrou dois alelos com praticamente o mesmo número de distanciamento encontrado no bovino.

Embora Sousa et al. (2008) tenham considerado os fragmentos encontrados como ampliações inespecíficas em algumas amostras, o tamanho dos fragmentos sugere um polimorfismo na região promotora e estudos de sequenciamento seriam necessários para a confirmação da variação.

Relacionando os dados de produção de leite ao polimorfismo encontrado, na raça Alpina, que obteve um indivíduo heterozigoto, os animais que apresentaram fragmentos de menor tamanho produziam leite ligeiramente com teor de gordura maior que os que possuíam fragmentos com maior número de pares de base, entretanto não houve confirmação estatística. O baixo número de animais gera dados insuficientes para se concluir a respeito do efeito deste polimorfismo.

Mioranza (2006) sequenciou uma região diferente do gene *DGATI* em caprinos, que compreende a porção codificante do gene em cabras de alto e baixo rendimento de gordura no leite. Ao comparar os resultados com a sequência gênica de bovinos, disponível em banco de dados, observou-se seis transições e seis transversões, sendo que cinco situavam-se na região codificadora do gene, mas como o código genético é degenerado, não houve mutação no aminoácido traduzido. Segundo Lewin (1997 *in* Mioranza, 2006), nos genes as sequências de éxons são mais conservadas, já os íntrons apresentam maiores variações. O trabalho de Mioranza (2006) sugere que o *DGATI* em caprino apresenta regiões bastante conservadas ao passo que a região promotora parece ser mais variável.

### **Conclusões**

Os primers desenhados se mostraram pouco eficientes nas três espécies analisadas, provavelmente por apresentar variações nucleotídicas na região de anelamento do primer. Foi encontrado um polimorfismo de VNTR na região promotora do gene *DGATI* nas raças caprinas Alpina e Saanen.

## Referências

- ANTUNES, A. J. **Funcionalidades de proteínas do soro do leite bovino**. Barueri: Manole, 2003.
- ALFÉREZ, M.J.M.; BARRIONUEVO, M.; LÓPES ALIAGA, I. et al. Digestive utilization of goat and cow milk fat in malabsorption syndrome. **Journal of Dairy Research**, v. 68, p. 451-461, 2001.
- BAUMAN, D. E.; MATHER, I. H.; WALL, R. J. et al. Major Advances Associated with the Biosynthesis of Milk. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 4, p. 1235-1243, 2006.
- BENCINI R.; PULINA G. The quality of sheep milk: a review. **Wool Technology and Sheep Breeding**, v. 45, n. 3, p. 182-220, 1997.
- BRITO, M.A.; GONZÁLVEZ, F.D.; RIBEIRO, L.A. et al. Composição do sangue e do leite em ovinos leiteiros do sul do Brasil: variações na gestação e na lactação. **Ciência Rural**, v. 36, n. 3, p. 942-948, 2006.
- CASES, S.; SMITH, S. J.; ZHENG, Y. et al. Identification of a gene encoding an acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, p. 13018–13023, 1998.
- KUHN, C.; THALLER, G.; WINTER, A. Evidence for multiple alleles at the *DGATI* locus better Explains a effect on milk fat content in cattle. **Genetics**, v. 167, p. 1873-1881, 2004.
- MIORANZA, A. **Análise de polimorfismo do gene *DGATI* em caprinos**. Trabalho de conclusão de curso – Ciências Biológicas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel. 2006.
- MUHAMMAD L.A.; YE, G.N.; WEEDEN, N.F. et al. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars, *Vitis* species an *Ampelopsis*. **Plant. Mol. Biol. Rep.**, v. 12, n. 1, p. 6-13, 1994.
- PERES, J.R. [2001] O Leite como Ferramenta do Monitoramento Nutricional. **Uso do Leite para Monitorar o a Nutrição e o Metabolismo de Vacas Leiteiras**. Porto Alegre, p. 30-45, 2001. Disponível em: <[http://www6.ufrgs.br/bioquimica/extensao/anais\\_2001.pdf#page=30](http://www6.ufrgs.br/bioquimica/extensao/anais_2001.pdf#page=30)>. Acesso em: Abril/2008.
- SOUSA, A.C.; SOARES, M.A.S.; RODRIGUES, M.T. Análises preliminares da região promotora do gene *DGATI* em caprinos leiteiros. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre. v.6, p.55-56, 2008.
- THALLER, G.; KRÄMER, W.; WINTER, A. et al. Effects of *DGATI* variants on milk production traits in German cattle breeds. **Journal of Animal Science**, v.81, p.1911-1918, 2003.

WINTER, A.; KRÄMER, W.; WERNER, F.A.O. et al. Association of a Lysine/232/Alanina polymorphism in a bovine gene encoding acyl-CoA:diacylglycerol Acyltransferase (*DGATI*) with variation at a quantitative trait locus for milk fat content. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 14, p.9300-9305, 2002.

WINTER, A.; ALZINGER, A.; FRIES, R. Assessment of the gene content of the chromosomal regions flanking bovine *DGATI*. **Genomics**, v.83, p.172-180, 2004.