



Efeito dos polimorfismos genéticos na região promotora do gene DGAT1 sobre características da produção leiteira na raça Guzerá

Gustavo Bastos Costa^{1a}, Raphael Steinberg da Silva¹, Gutemberg E. Sousa¹,
Marco Antônio Machado², Maria Gabriela Campolina Diniz Peixoto², Rui da Silva Verneque², Maria Raquel Santos Carvalho¹

^{1a} Aluno de iniciação científica – UFMG. e-mail: gustavobcosta@ufmg.br

¹ Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas – UFMG. e-mail: mraquel@icb.ufmg.br

² Embrapa Gado de Leite/ Juiz de Fora. e-mail: gaby@cnppl.embrapa.com.br

Resumo: A acilCoA-diacilglicerol-aciltransferase 1 (DGAT1) é uma enzima chave na via metabólica de produção de gordura. Variantes desta enzima têm sido correlacionadas a parâmetros da produção leiteira. Recentemente, uma repetição em tandem de número variável (*variable number of tandem repeat*, VNTR) foi identificada no promotor do gene DGAT1 bovino. Foi descrito que, em animais da raça Holstein, diferentes alelos nesta VNTR se correlacionariam com diferenças na produção leiteira e no percentual de gordura do leite. O presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de avaliar o efeito deste polimorfismo na raça Guzerá. Neste trabalho, foram genotipados para a VNTR no promotor do gene DGAT1 animais pertencentes ao núcleo MOET do Guzerá de seleção para leite. Foram identificados 6 alelos, sendo os mais freqüentes o 3 e o 4. Na análise de variância utilizou-se dados de famílias de irmãos completos e meio-irmãos dos reprodutores do núcleo MOET, sob modelo de substituição gênica. Identificamos associações altamente significativas ($P_s < 0,0003$) do polimorfismo da VNTR em DGAT1 com os valores genéticos (Vg's) para produção de leite, gordura e proteína, com efeitos variáveis para os genótipos. Nosso próximo passo será aplicar testes *post hoc* para melhor caracterizar os efeitos dos alelos.

Palavras-chave: DGAT1, Guzerá, melhoramento assistido por marcadores, melhoramento genético, VNTR, Zebu

Effect of genetic polymorphisms in the promoter region of the gene DGAT1 on characteristics of milk production in Guzerat breed

Abstract AcilCoA-diacylglycerol-aciltransferase 1 (DGAT1) is a key enzyme in the metabolic pathway for the production of fat. Variants of this enzyme have been correlated to parameters of milk production. Recently, a variable number of tandem repeat, (VNTR) has been identified in the promoter of the gene DGAT1. It was described that in animals of the Holstein breed, different alleles in this VNTR would be correlated with differences in milk production and in the percentage of milk fat. This study was designed to evaluate the effect of this polymorphism in the Guzerat breed. In this work, animals belonging to the core of MOET Guzerá for milk selection were genotyped for the VNTR in the promoter of the gene DGAT1. Six alleles were identified, being alleles 3 and 4 the most frequent. Data on families of complete brothers and half-brothers were used in the analysis of variance under gene replacement model. Associations identified were highly significant ($P_s < 0,0003$) for the genotypes on the DGAT1 VNTR polymorphism with breeding values for milk, fat and protein. Our next step will to apply *post hoc* tests to better characterize the effects of alleles.

Keywords: DGAT1, Guzerat, marker assisted selection, genetic improvement, VNTR, Zebu.

Introdução

O gene DGAT1 codifica a acilCoA-diacilglicerol-aciltransferase 1, que é uma enzima chave para a biossíntese de triglicerídeos, essencial à via metabólica de produção de gordura. Recentes estudos têm demonstrado que polimorfismos do gene DGAT1 estão relacionados à variação no teor de gordura do leite. O polimorfismo estudado neste trabalho é uma repetição em tandem de número variável (*variable number of tandem repeat*, VNTR) que mapeia a 5' do gene. O monômero desta VNTR é o elemento 18mer AGGCCCGCCCTCCCCGG, que possui o motivo CCCGCC, sítio de ligação para o fator de transcrição Sp1. Em eucariotos, esta seqüência pode atuar como acentuador (*enhancer*) da transcrição. Em função disto, foi proposto que diferentes alelos na DGAT1 VNTR possam influenciar

diferentemente a expressão gênica (Fürbass et al., 2005). Foram descritos na literatura 5 alelos da VNTR, que se diferenciam pelo número de repetições do 18mer, sendo cada alelo nomeado em ordem crescente pelo número de repetições que contém (de 3 a 7 repetições). Foi descrito que o alelo 5 em DGAT1 VNTR estaria associado a maior conteúdo de gordura no leite, com um efeito semelhante ao alelo 232K, do mesmo locus (Kühn et al., 2004).

A raça Guzerá (*Bos indicus*) apresenta características de grande interesse econômico, como a sua rusticidade, que o tornou um animal bem adaptado a diversos ecossistemas no Brasil, e sua dupla aptidão (leite e corte). A raça tem sido alvo de melhoramento genético, através do “Programa Nacional de Melhoramento do Guzerá para Leite”, integrante do projeto “Otimização do Ganho Genético em Rebanhos Zebus Leiteiros”, da EMBRAPA Gado de Leite, de Juiz de Fora. Havendo poucos os estudos de associação dos polimorfismos genéticos que influenciam a produção leiteira das raças de *Bos indicus*, é objetivo deste trabalho o estudo da variação e do efeito do polimorfismo genético da DGAT1 VNTR sobre as características de produção de leite na raça Guzerá.

Material e Métodos

Foram utilizados 169 animais para determinar as freqüências alélicas e genotípicas e um subconjunto de 106 para os estudos de correlação, todos animais da raça Guzerá, participantes do Núcleo de Ovulação Múltipla e Transferência de Embriões (MOET). O DNA genômico foi obtido do Banco de DNA da EMBRAPA - Gado de leite, extraído pelo método proteínase K-fenol:clorofórmio, a partir de amostras de sangue e sêmen. As genotipagens para os polimorfismos da DGAT1 VNTR foram feitas através de PCR (Kühn et al., 2004). A separação dos alelos do polimorfismo foi feita por eletroforese em gel de poliacrilamida 8% corado por prata. As freqüências genotípicas e alélicas foram calculadas e submetidas à análise do equilíbrio de Hardy-Weinberg, usando-se o programa GenePOP. A produção de famílias contendo meios-irmãos e irmãos completos, nas quais se baseia a construção do núcleo MOET, permitiu a realização do estudo de segregação e associação dentro de famílias (Peixoto et al., 2007). Nos estudos de associação foi realizada análise de variância para dados desbalanceados, utilizando o procedimento GLM disponível no pacote computacional SAS®. Foi usado um modelo de substituição gênica (Israel e Weller, 2002). Nas análises de variância, foi utilizado o seguinte modelo geral:

$$y = Zu + e$$

Em que y é o vetor de observações individuais das variáveis; Z é a matriz de incidência dos efeitos aleatórios de reprodutor, incluindo o efeito do marcador dentro de reprodutor, u é o vetor dos efeitos fixos e e o resíduo.

Resultados e Discussão

A Tabela 1 apresenta os valores de freqüências alélicas observadas em 169 animais. Os alelos mais freqüentes foram o 3 (34,7%) e o 4 (36%). A Tabela 2 apresenta os valores de freqüências genotípicas. Os genótipos mais freqüentes foram o 7 (2,3), com freqüência de 12,07% , 8 (2,4) com 18,53% , 10 (3,3) com 11,64% , 11(3,4) com 29,31%, e o 14(4,4) com 9,05%.O marcador DGAT1 VNTR está em Equilíbrio de Hardy-Weinberg (P=0,053). A grande quantidade de heterozigotos nessa população pode ser resultado da seleção assistida na qual evita-se cruzamentos co-sanguíneos visando benefício do rebanho

Tabela 1 - Freqüências alélicas para os polimorfismos da VNTR nos animais MOET Guzerá

Freqüências Alélicas						
Alelos	0	1	2	3	4	5
Freqüências	0.006	0.039	0.222	0.347	0.360	0.026

Tabela 2 - Freqüências genotípicas para os polimorfismos da VNTR nos animais MOET Guzerá

Freqüências Genotípicas								
Genótipos	1 (1,2)	2 (1,3)	3 (1,4)	4 (1,5)	5 (0,2)	6 (2,2)	7 (2,3)	8 (2,4)
Freqüências%	1,29	1,72	4,31	0,43	0,43	5,6	12,07	18,53
Genótipos	9 (3,0)	10 (3,3)	11 (3,4)	12 (3,5)	13 (4,0)	14 (4,4)	15 (4,5)	16 (5,2)
Freqüências%	0,43	11,64	29,31	2,59	0,43	9,05	1,29	0,88

Nota: Ao lado de cada genótipo encontram-se entre parênteses os alelos que o compõe.

Os resultados das correlações estão explicitadas na Tabela 3 abaixo. Resultados altamente significativos da presença dos alelos foram observados.

Tabela 3 Resumo da análise de variância valores genéticos de produção de leite durante 305 dias de lactação, quantidade de gordura e proteína no leite para estudo da associação com o polimorfismo da VNTR-DGAT.

Valor genético para produção de leite (kg)			
Fonte de Variação	GL	Quadrados Mínimos	PR>F
Reprodutor	21	205074,564	<0,0001
Genótipo da VNTR dentro de reprodutor	36	33337,856	<0,0003*
Resíduo	48	11310,673	
Valor genético para produção de gordura (kg)			
Fonte de Variação	GL	Quadrados Mínimos	PR>F
Reprodutores das famílias	21	449,592	<0,0001
Genótipo da VNTR dentro de reprodutor	36	69,35	=0,0001*
Resíduo	48	22,08	
Valor genético para produção de proteína (kg)			
Fonte de Variação	GL	Quadrados Mínimos	PR>F
Reprodutores das famílias	21	19,57	<0,0001
Genótipo da VNTR dentro de reprodutor	36	3,08	=0,0001*
Resíduo	48	10,84	

Os genótipos com efeito mais significativos sobre características do leite e produção tanto de forma positiva (genótipo 16) quanto negativa (genótipo 15), (maiores e menores Vg's) apresentaram o alelo 5. Porém, tiveram a avaliação de seus efeitos prejudicadas, em função da baixa frequência destes genótipos. O genótipo 14 apresentou uma frequência genotípica de 8,62% e Vg's baixos em relação a outros genótipos frequentes sendo seu Vgl=163,6kg, Vgg=7,4kg e Vgp=5,9kg. Desta forma, seria interessante confirmar este achado em uma amostra maior. Dentre os genótipos com maiores frequências observadas, o que apresentou maiores Vg's foi o 11 com frequência de 20,69% e Vgl=395,3kg, Vgg=17,1kg e Vgp=12,1kg. Não fizemos estudos de associação da DGAT1 VNTR com o locus polimórfico 232 do DGAT, pois em rebanhos zebuínos a presença do alelo 232 A é extremamente baixa (Lacorte et al, 2006). Portanto nosso estudo evidencia os efeitos da DGAT1 VNTR na presença do alelo 232 K, o que de certa forma nos mostra efeitos independentes dos alelos do polimorfismo da região promotora.

Conclusões

Foi possível observar um efeito altamente significativo do reprodutor e do genótipo do reprodutor quanto a VNTR à 5' do gene DGAT1 sobre o valor genético em produção de leite, gordura e proteína no leite. Nosso próximo passo será aplicar testes *post hoc* para melhor caracterizar os efeitos dos alelos.

Literatura citada

- CHRISTA KUHN , GEORG THALLER , ANDREAS WINTER , OLAF R. P.BININDA-EMONDS , BERNHARD KAUPE , GEORG ERHARDT , JORN BENNEWITZ, MANFRED SCHWERIN AND RUEDI FRIES. Evidence for Multiple Alleles at the DGAT1 Locus Better Explains a Quantitative Trait Locus With Major Effect on Milk Fat Content in Cattle. **Genetics**, Vol. 167, p.1873-1881, 2004.
- G.A. LACORTE, M.A. MACHADO, M.L. MARTINEZ, A.L. CAMPOS, R.P. MACIEL, R.S. VERNEQUE, R.L. TEODORO, M.G.C.D. PEIXOTO, M.R.S. CARVALHO AND C.G. FONSECA DGAT1 K232A polymorphism in Brazilian cattle breeds **Genet. Mol. Res.** 5(3):475-82 2006
- ISRAEL, C.; WELLER, J. I. Estimation of quantitative trait loci effects in dairy cattle populations. **J. Dairy Sci.** v.85, p.1285-1297, 2002.
- PEIXOTO, M. G. C. D.; MARTINEZ, M. L.; TEODORO, R. L.; CARVALHO, M. R. S.; MACHADO, M. A.; EUCLYDES, R. F.; GOMES, F. C.; VERNEQUE, R. S. Avaliação de metodologias para validação de QTL utilizando a estrutura de família de um núcleo Moet. Reunion de la Asociacion Latinoamericana de Produccion Animal. 20. 2007, **Arch. Latinoam. Prod. Anim.** Vol 15 (Supl.1). Cusco, Perú. Alpa. 1p. 1 CD, 2007.
- RAINER FURBASS, ANDREAS WINTER , REUDI FRIES AND CHRISTA KUHN. Alleles of the bovine DGAT1 variable number of tandem repeat associated with a milk fat QTL at chromosome 14 can stimulate gene expression. **Physiol Genomics** vol 25: p.116-120, 2006; doi:10.1152/physiolgenomics.00145.2005.