

X Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Uberaba, MG – 18 a 23 de agosto de 2013

Análise da região promotora do gene *DGAT1* em búfalos no Rio de Janeiro

Ramon de Sousa Rego², Ana Lúcia Puerro³, Rosana Colatino³, Leonardo Ferreira², Maria Amélia Menck Soares⁴

¹Trabalho financiado pela - Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro- FAPERJ

²Programa de Pós-Graduação em Zootecnia – UFRRJ, Seropédica, RJ. Bolsista do CNPq. e-mail: ramonrego@hotmail.com

³Instituto de Zootecnia – UFRRJ, Seropédica, RJ. E-mail: analupuerro@yahoo.com.br; rcolatino@yahoo.com.br

⁴Instituto de Biologia – UFRRJ, Seropédica, RJ. e-mail: mamsoares@ufrj.br

Resumo: A acil CoA: diacilglicerol aciltransferase 1 (*DGAT1*) é uma enzima microsossomal que catalisa a última etapa na síntese do triacilglicerol, usando o diacilglicerol e o ácido graxo-acil CoA como substratos. Na região promotora do gene *DGAT1* foi descrito um polimorfismo de número variável de repetições em tandem (VNTR) o qual já foi associado com variações na produção de gordura no leite em bovino, motivo que torna importante o estudo desse gene para o melhoramento em rebanhos leiteiros. O estudo foi realizado num pequeno rebanho de búfalos leiteiros da região de Mazomba-Itaguaí no estado do Rio de Janeiro. As análises foram feitas no laboratório de genética no Instituto de Biologia da UFRRJ. Foram observados fragmentos com tamanho aproximado de 770 pares de bases com diferentes tamanhos. Por intermédio de sequenciamento de bases foi constatada a identidade do fragmento avaliado e foi observado que as diferenças de tamanho são devidas à presença de um ou dois VNTRs na região promotora do *DGAT1*. Com estes resultados sugere-se que esse polimorfismo possa influenciar na expressão do locus *DGAT1* na glândula mamária, produzindo diferentes níveis de gordura no leite por ser uma região de ligação do fator de transcrição SP1. Para este propósito, será necessário dar continuidade a estes estudos em animais com dados de produção para a verificação da influência deste VNTR sobre a produção de gordura do leite em Búfalos.

Palavras-chave: gordura do leite, pcr, vntr, região promotora

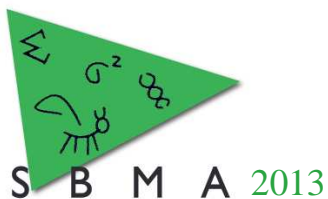
Analysis of the promoter region of the *DGAT1* gene in buffaloes in Rio de Janeiro

Abstract: The acyl CoA: diacylglycerol acyltransferase 1 (*DGAT1*) is a microsomal enzyme that catalyzes the last step in triacylglycerol synthesis by using diacylglycerol and fat acyl CoA as substrates. In the promoter region of the *DGAT1* gene was described polymorphism variable number of tandem repeats (VNTR) which has been associated with variations in the production of milk fat in cattle, reason that makes the study of this important gene for improvement in dairy cattle. The study was conducted in a small herd of buffalo dairy from the region of Mazomba-Itaguaí in the state of Rio de Janeiro. The analyzes were performed in the laboratory of genetics at the Institute of Biology of UFRRJ. Fragments were observed with approximate size of 770 base pairs with different sizes. Through the intermediary of base sequencing was found the identity of the fragment and was observed and reported that the size differences are due to the presence of one or two VNTRs in the promoter of *DGAT1*. These results suggest that this polymorphism may influence the expression of *DGAT1* locus in the mammary gland by producing different levels of milk fat to be a binding region of transcription factor SP1. For this purpose, it will be necessary to continue these studies in animals with production data to verify the influence of this VNTR on the production of milk fat in buffaloes.

Keywords: fat milk, pcr, vntr, promoter region

Introdução

Os triglicerídeos (ou triacilgliceróis) representam a forma principal da energia armazenada nos eucariotos. A acil CoA: diacilglicerol aciltransferase 1 (*DGAT1*) é uma enzima microsossomal que catalisa a última etapa na síntese do triacilglicerol, usando o diacilglicerol e o ácido graxo-acil CoA como substratos. A enzima *DGAT1* possui papel fundamental no metabolismo de lipídios em diversos tecidos, incluindo a glândula mamária (Cases et al., 1998). A sequência completa do gene *DGAT1* em búfalos abrange uma região de 8,3 Kb genômico com 16 introns e 17 exons (Yuan et al., 2007). A análise da região promotora deste gene em diferentes espécies produtoras de leite, incluindo bubalinos, mostrou a ocorrência de polimorfismo de número variável de repetições em tandem (VNTR) de 18 nucleotídeos



(AGGCCCGCCCTCCCCGG), essa sequência possui afinidade com o fator de transcrição Sp1 que está envolvido com a regulação deste gene, sendo também encontrado em promotores de outros genes.

Esse polimorfismo já foi associado ao efeito adicional na produção de gordura no leite em bovinos (Kuhn et al., 2004), porém não foram encontradas pesquisas para esse polimorfismo em búfalos no Brasil, fato que ressalta a necessidade da pesquisa para o melhoramento genético nessa espécie. Com o presente trabalho objetivou-se identificar se o polimorfismo ocorre na região promotora do gene e em quantas repetições se apresenta nos rebanhos nacionais, com o intuito de utilizar como marcador molecular para a gordura do leite.

Material e Métodos

A coleta do material biológico foi realizada no Sítio São Judas Tadeu, localizado no município de Itaguaí, distrito de Mazomba, RJ. Para tal, foram utilizados 20 mL de sangue de 16 bubalinos leiteiros mestiços das raças Murrah e Mediterrâneo, coletados da circulação periférica em tubos de EDTA a 8% e mantidos a temperatura de 4°C para coleta de Leucócitos. Para extrair o DNA do sangue dos animais, foram utilizados leucócitos com o tampão de extração descrito por Muhammad et al. (1994), a base de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB).

Um par de oligonucleotídeos (*primer*) possibilitou a amplificação da região promotora do gene *DGATI*, desenhados com base na sequência genômica de bovinos disponível no *GenBank* (AJ318490). O *primer* utilizado apresenta a seguinte formação DGAT – pro R (5' AGTAGCCACTGACGAGTGAAG 3') e DGAT – pro F (5' GCCTAGCCTTGTCTCCACAG 3').

A amplificação dos fragmentos foi realizada em termociclador (Biotraza, LongGene®, Modelo MG96+) pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) que continha o par de Primer, DNA genômico, *Taq* DNA polimerase, dNTPs, MgCl₂, Tris_HCl, KCl, e água ultra-pura. Esta amplificação foi composta por três etapas: (a) desnaturação da fita molde, (b) anelamento dos *primers* e (c) síntese da nova fita de DNA pela *Taq* DNA polimerase.

A visualização foi feita em gel de poliacrilamida a 12%, com voltagem a 200 volts por um período de 12 horas juntamente com tampão de corrida TBE. O gel de foi corado em solução de nitrato de prata em concentração de 12% e hidróxido de sódio a 18%.

Os fragmentos de PCR de diferentes tamanhos foram enviados para a empresa MacroGen (www.macrogen.com) para a determinação da sequência de bases pelo método de terminação de cadeia (Sanger et al., (1977).

Resultados e Discussão

A análise dos fragmentos do gene apresentou tamanho aproximado de 770 pares de bases. Entretanto, quando comparados os tamanhos dos fragmentos em gel de poliacrilamida a 12%, verificou-se a diferença no tamanho das amostras, fato que evidencia a existência de polimorfismo entre os animais. Esse mesmo polimorfismo já havia sido relatado na espécie de estudo e também em bovinos, ovinos e caprinos. Em bovinos foram encontrados sete alelos com repetições variando de duas a oito sequências do VNTR (Gautier et al. 2007). Kuhn et al. (2004) associou o VNTR à produção de gordura em bovinos, sendo o alelo com sete repetições o que apresentou efeito adicional na gordura do leite. Yuan et al., (2007) ao estudar esse gene em búfalos encontrou quatro repetições desse polimorfismo, porém esse polimorfismo não foi associado características de produção.

Na figura 1, podem ser observados os produtos da análise de PCR, com diferenças no tamanho dos fragmentos, os quais foram classificados como: alelo alto com a presença de dois VNTR (VNTR2) e o alelo baixo com a presença de apenas um VNTR (VNTR1). Os sequenciamentos dos fragmentos foram comparados pelo programa CLUSTALW 2.1 (www.genome.jp/tools/clustalw/) que evidenciou a presença de uma repetição da sequência no alelo baixo e duas repetições no alelo alto. Figura 2.

Fürbass et al. (2006) ao analisar a ação do VNTR na região promotora do *DGATI* em bovinos sugeriu que quanto maior o número de repetições nessa na região promotora do gene maior o número de sítios de ligação para o fator de transcrição Sp1 que potencializa a expressão da enzima. Assim espera-se que o maior número de VNTRs em genótipos seja desejável para a produção de gordura no leite.

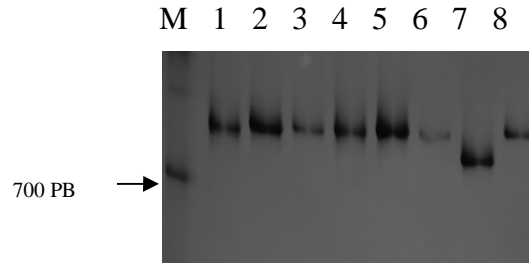


Figura 1. Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) 12% de produtos do PCR de fragmentos da região promotora do gene *DGATI*. M - marcador molecular 100 pb (Amresco®). Colunas 1 a 6 e 8 animais homocigotos VNTR2 e coluna 7 animal homocigoto VNTR1.

```

VNTR2      CTGTAGGCCCCCGCCCTCCCCGGAGGCCCCCGCCCTCCCCGGAGGCCCCCGCCCTGTA
VNTR1      CTGTAGGCCCCCGCCCTCCCCGG-----AGGCCCCCGCCCTGTA
  
```

Figura 2. Sequencia de nucleotídeos da região promotora do *DGATI* dos dois alelos (VNTR1 e VNTR2). CLUSTALW 2.1

Conclusões

Conclui-se que a variação em números de VNTR é presente no rebanho estudado, porém com menor número de repetições que os divulgado em outros estudos em búfalos fora do Brasil.

Literatura citada

- CASES, S.; SMITH, S. J.; ZHENG, Y. W. et al. Identification of a *gene* encoding an acyl Co A : diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis. *Proceedings of National Academy of Science of the United States of America*, 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.
- 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.
- MUHAMMAD, L. A. G. N.; YE, N. F.; WEEDEN N. F. et al. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars, *Vitis* species an *Ampelopsis*. *Plant Mol. Biol.*, v. 12, p. 6-13, 1994.
- YUAN, J.; ZHOU, J.; DENG, X. et al. Molecular Cloning and Single Nucleotide Polymorphism Detection of Buffalo *DGATI* Gene. *Biochem Genet*, v.45, p. 611–621, 2007.