

Análises Preliminares da Região Promotora do Gene *DGAT1* em Caprinos Leiteiros

Ana Carolina de Sousa¹, Maria Amélia Menck Soares^{2*}, Marcelo Teixeira Rodrigues³,
Luciana Paula Grégio d'Arce Rodrigues², Vickeline Namba¹ e Renan Baratto Souza¹

Introdução

O leite é um complexo fluido biológico que contém um balanço de nutrientes, primariamente proteínas, gordura, lactose e minerais, que tem função preliminar de assegurar o crescimento e o desenvolvimento do mamífero recém-nascido [1]. Sua composição varia consideravelmente nas diferentes espécies animais durante o período de lactação, o que vai depender diretamente de alguns fatores como estação do ano, diferença entre as raças, condições de alimentação e secreção hormonal [2, 3].

Uma das principais características do leite de cabra refere-se ao menor tamanho dos glóbulos de gordura quando comparado aos do bovino. Isto torna o leite de cabra mais digerível, pois além do tamanho reduzido dos glóbulos, eles também apresentam uma área de superfície maior. Além disso, a porcentagem de triacilglicerol de cadeia média é mais elevada no leite de cabra do que no leite de vaca (36% comparado a 21%, respectivamente) o que facilita a assimilação, diminuindo dessa forma o refluxo gastroesofágico provocado em alguns casos pelo leite de vaca [4].

O seqüenciamento do gene *DGAT1* 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 [5]. Em uma análise feita com um rebanho bovino [6], foi encontrado uma seqüência de 18 nucleotídeos (AGGCCCGCCCTCCCCGG), correspondendo a um elemento de número variável de repetições em tandem (VNTR) localizado na região promotora do gene, ocasionando alteração de grande influência na concentração de gordura no leite.

Este gene tornou-se candidato para características de lactação quando o gene *DGAT1* foi inativado em ratos (*DGAT1* -/-), sendo que estes ratos eram viáveis, saudáveis e férteis, porém as fêmeas não eram capazes de secretar leite [7].

Com o presente trabalho objetivou-se amplificar a região promotora do gene *DGAT1* caprinos leiteiros para verificar se a mutação presente em bovinos também existe em caprinos

Material e métodos

Foram utilizadas 20 cabras leiteiras das raças Alpina e Saanen que estão no Setor de Caprinocultura da Universidade Federal de Viçosa em Minas Gerais.

A extração do DNA genômico foi realizada a partir

das células brancas do sangue com o reagente brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB).

Foi sintetizado um par de *primers*, com anelamento específico na região promotora do gene *DGAT1*, desenhado com base na seqüência gênica de bovino, disponível no *GenBank* (nº de acesso AJ318490). A amplificação do fragmento foi conduzido em termociclador com a 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, completando um volume final de 20µL. Um programa (ciclo) de amplificação consistiu de: denaturação da fita molde, anelamento dos *primers* e extensão da fita pela *Taq* DNA polimerase. Estas etapas foram repetidas em torno de 35 vezes, até obter-se uma quantidade suficiente do fragmento desejado para as análises. Os fragmentos amplificados foram visualizados em gel de poliacrilamida 5% e corado com nitrato de prata.

Resultados e discussão

Até o momento foram amplificadas amostras de DNA de 20 fêmeas utilizando-se os *primers* específicos da região promotora do gene *DGAT1* de bovino. Foi observado, em gel de poliacrilamida, um fragmento com tamanho correspondente ao esperado, com cerca de 777 pares de bases (pb), quando comparando com a seqüência genômica de bovinos. Porém, um fragmento menor esteve presente em algumas amostras, com tamanho aproximado de 650 pb.

A existência de dois fragmentos faz supor que um possível polimorfismo na região promotora do gene *DGAT1* em caprinos possa estar existindo ou o *primer* está sendo anelado em uma região não específica.

Embora possa sugerir polimorfismo, estes fragmentos apresentam tamanhos muito distintos, incompatível com diferenças menores, como a de um VMTR [6]. Neste sentido, para descobrir a natureza destas duas bandas, estudos estão sendo realizados para esclarecer o surgimento destas diferenças de tamanho.

Agradecimentos

À coordenação local do GENOPAR pela disponibilidade dos equipamentos. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro.

1. Acadêmico de Ciências Biológicas. Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

2. Professor Adjunto. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. R Universitária, 2069, Cascavel, PR, CEP 85819-110.

3. Professor Adjunto da Universidade Federal de Viçosa.

* Autor para contato: E-mail: masoares@certto.com.br

Apoio financeiro: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG.

Referências

- [1] MARTIN, P.; OLLIVIER-BOUSQUET, M.; GROSCLAUDE, F. 1999. Genetic polymorphism of caseins: a tool to investigate casein micelle organization. *International Dairy Journal* 9:163-171.
- [2] AGUIAR, C.L.; CORÓ, F.A.G.; PEDRÃO, M.R. 2005. Componentes ativos de origem animal. *B. Ceppa* 23: 413-434.
- [3] CANTAROW, A.; SCHEPARTZ, B. 1969. *Bioquímica*. Rio de Janeiro: Livraria Atheneu S.A., p 846-849.
- [4] ALFÉREZ, M.J.M.; BARRIONUEVO, M.; LÓPES ALIAGA, I.; SANZ-SAMPELAYO, M.R.; LISBONA, F.; ROBLES, J.C.; CAMPOS, M.S. 2001. Digestive utilization of goat and cow milk fat in malabsorption syndrome. *Journal of Dairy Research* 68: 451-461.
- [8] *Nature Genetics* 25: 87-90.
- [5] WINTER, A.; KRÄMER, W.; WERNER, F.A.O.; KOLLERS, S.; KATA, S.; DURSTEWITZ, G.; BUITKAMP, J.; WOMACK, J.E.; THALLER, G.; FRIES, R. 2002. 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. *PNAS* 99:(14):9300-9305.
- [6] KUHN, C.; THALLER, G.; WINTER, A. 2004. Evidence for multiple alleles at the *DGAT1* locus better explains a effect on milk fat content in cattle. *Genetics Society of the America* 167: 1873-1881
- [7] SMITH, S.J.; CASES, S.; JENSEN, D.R.; CHEN, H.C.; SANDE, E.; TOW, B.; SANAN, D.A.; RABER, J.; ECKEL, R.H.; FARESE JR, R.V. 2000. Obesity resistance and multiple mechanisms of triglyceride synthesis in mice lacking *DGAT*.

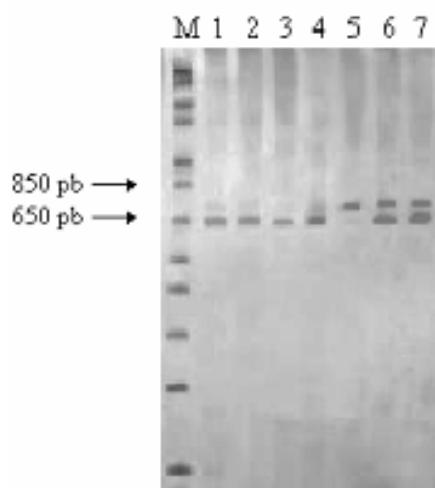


Figura 1. Gel de poliacrilamida 5% corado com nitrato de prata. M= marcador de peso molecular. Canaletas de 1 a 7: fragmentos amplificados com amostras de DNA de diferentes animais caprinos. Banda superior: fragmento com tamanho teórico de 777pb; Banda inferior: fragmento com tamanho aproximado de 650 pb.