

X Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal  
Uberaba, MG – 18 a 23 de agosto de 2013

**Varredura por polimorfismos no gene *ABCG2* em raças zebuínas (*Bos taurus indicus*) leiteiras**

Diercles Francisco Cardoso<sup>1</sup>, Daniele Portela de Oliveira<sup>2</sup>, Izinara Rosse da Cruz<sup>3</sup>, Maria Raquel Santos Carvalho<sup>3</sup>, Aníbal Eugênio Vercesi Filho<sup>4</sup>, Humberto Tonhati<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento Animal – UNESP, Jaboticabal. e-mail: [diercles.cardoso@yahoo.com.br](mailto:diercles.cardoso@yahoo.com.br)

<sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Zootecnia – UNESP, Jaboticabal

<sup>3</sup>Programa de Pós graduação em Genética – UFMG, Belo Horizonte-MG.

<sup>4</sup>Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios - PRDTA – Nordeste Paulista – Mococa SP.

**Resumo:** O gene *ABCG2* codifica a proteína de resistência ao câncer de mama (BCRP) e vem sendo estudado em raças bovinas como marcador para características de importância econômica na produção de leite. O presente estudo teve como objetivo a caracterização parcial do gene *ABCG2* nas raças Gir Leiteiro e Guzerá. Para tanto, foram extraídas amostras de DNA de 21 vacas Guzerá e 25 vacas Gir. Foram amplificados por PCR fragmentos abrangendo os exons 7, 9, 12, 13 e 14. Cada fragmento foi sequenciado para análise de mutações nas duas raças. Foram identificados 17 SNPs na raça Gir Leiteiro e 16 SNPs na raça Guzerá. Uma nova mutação não sinônima foi identificada segregando nas duas raças. A mutação considerada causal nas raças taurinas não foi encontrada na presente amostra. Foi identificada uma divergência na proteína BCRP entre as subespécies bovinas. Este estudo abre a possibilidade de posteriores análise de associação com registros fenotípicos de interesse.

**Palavras-chave:** BCRP, exons, Gir Leiteiro, Guzerá, proteína, SNPs

**Scanning by polymorphisms in *ABCG2* gene of Zebu breeds (*Bos taurus indicus*) employed in the production of milk.**

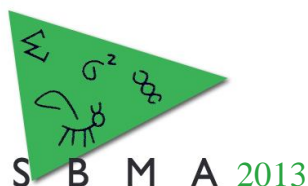
**Abstract:** The *ABCG2* gene encodes the Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) and has been studied in cattle breeds as a marker to economic importance traits of milk production. This study aimed to characterize partially the *ABCG2* gene in dairy Gir and Guzera breeds. DNA was extracted from 21 Gyr and 25 Guzerá cows and were amplified by PCR five fragments that covered the exons 7, 9, 12, 13 and 14. Each fragment was sequenced in order to analyze possible mutations in both breeds. It was identified 17 SNPs in the Dairy Gir and 16 SNPs in the Guzerá. It was reveals a novel missense mutation in both breeds. The mutation considered as a causal mutation in European breeds was not polymorphic in this sample. It was identified a divergence in the BCRP protein between the cattle subspecies. This study opens the possibility for further analysis of association with phenotypes records of interest

**Keywords:** BCRP, exons, dairy Gir, Guzerá, protein, SNPs

**Introdução**

O gene *ABCG2*, localizado no cromossomo 6 bovino, tem sido um dos candidatos posicionais para estudos relacionados a características de importância econômica na produção de leite. Embora codifique a proteína de resistência ao câncer de mama (BCRP) que é objeto comum de estudos farmacológicos em humanos, nos animais domésticos este gene demonstra estar relacionado à lactação. De acordo com Jonker et al. (2005), a expressão do gene *ABCG2* inicia nos alvéolos da glândula mamária de ratos na fase final da gestação e aumenta exponencialmente durante a lactação. Olsen et al. (2005) demonstraram que um QTL do cromossomo 6, fortemente relacionado à porcentagem de proteína e gordura em bovinos, está localizado entre os genes *LAP3* e *ABCG2*. Posteriormente, Cohen-Zinder et al. (2005) caracterizaram o gene *ABCG2* na raça Holandesa e sugeriram uma mutação não conservativa do exon 14 (Y581S) como a mutação causal da variação do rendimento de leite e constituintes. Os mesmos autores enfatizaram a influência do valor econômico da proteína no índice de seleção para bovinos da raça holandesa sobre a frequência alélica neste locus. Contudo, não houve até a presente data esforços na caracterização deste gene em raças zebuínas. Tantia et al. (2006) analisaram apenas o exon 14 em zebuínas criados na Índia e demonstraram que a mutação causal descrita em raças taurinas não segrega em populações zebuínas.

Sendo o Brasil um país de clima tropical, onde raças zebuínas constituem material genético importantíssimo na exploração da atividade leiteira e sendo o *ABCG2* um gene que não recebeu especial



atenção em estudos com marcadores moleculares voltados a esta subespécie, torna-se interessante a busca por polimorfismos que possam vir a corroborar com os métodos tradicionais de avaliação genética e seleção nas raças zebuínas leiteiras. Assim, este estudo teve por objetivo caracterizar parcialmente os exons do gene *ABCG2* nas duas principais raças zebuínas exploradas na atividade leiteira, Gir Leiteiro e Guzerá.

### Material e Métodos

Foram escolhidos para este estudo de caracterização animais não aparentados, que representam as principais linhagens brasileiras das raças Gir Leiteiro e Guzerá. A amostra utilizada foi composta por 21 vacas Guzerá criadas na fazenda Taboquinha (Itambacuri – MG) e 25 vacas da raça Gir pertencentes à Fazenda Morro D'água (Guapé – MG).

O DNA genômico foi extraído a partir de sangue periférico, seguindo o protocolo descrito por Miller et al. (1988). Cinco fragmentos do gene *ABCG2* foram amplificados e analisados neste estudo. A confecção dos primers levou em conta que o pareamento destes ocorresse em regiões de intron flanqueando exons previamente escolhidos, de modo que os fragmentos amplificados contivessem os exons 7, 9, 12, 13 e 14 com suas regiões flanqueadoras. Na tabela 1, são apresentados o tamanho do amplicon, os primers utilizados, e suas respectivas temperaturas de anelamento.

Tabela 1. Sequência de primers utilizados nas reações de PCR

Fragmentos	Comprimento (pb)	Sequência dos primers	Temp. anelamento (°C)
Exon 7 <sup>a</sup>	393	F: 5'-TAAAGGCAGGAGTAATAAAG-3' R: 5'-TAACACCAAACCTAACCGAAG-3'	63,5
Exon 9	403	F: 5'-AAAGGGTGTAGAAAAATGGA-3' R: 5'-TGGGCAGAAGATAAGCATAA-3'	54,9
Exon 12	694	F: 5'-GCAAATGGTTAATCTCCTGGT-3' R: 5'-CTCTGTGTGGGCATCTGT-3'	53,5
Exon 13	344	F: 5'-GGTGGTTGGATGAAGGATGA-3' R: 5'-GCAAGTTTGGGGTAGGAAT-3'	54,9
Exon 14	240	F: 5'-GTATTACAGAGACTGTCAGGG-3' R: 5'-GGCTTATTCTGGCTGTTCC-3'	58,1

<sup>a</sup> Par de primers retirado de Yue et al. (2011)

Os produtos amplificados por PCR foram purificados com o kit comercial Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System Promega<sup>®</sup> e então sequenciados com a técnica de terminação de cadeia por dideoxinucleotídeos (ddNTPS) a partir dos primers *forward* e *reverse*. As sequências de todos os animais foram analisadas no programa CodonCode Aligner quanto a presença de SNPs e similaridade com sequências taurinas. Esta análise foi realizada em cada fragmento, alinhando as sequências de Gir Leiteiro e Guzerá a uma sequência do mesmo fragmento deste gene em raças taurinas retiradas do GenBank. Os SNPs encontrados foram então nomeados com base na sua posição na sequência completa do gene *ABCG2* em raças taurinas disponível no Genbank (Número de acesso: NC\_007304.3).

### Resultados e Discussão

Dezessete SNPs foram identificados segregando na raça Gir Leiteiro e dezesseis SNPs na raça Guzerá. O polimorfismo g.61222T>C foi encontrado segregando na raça Gir Leiteiro, no entanto, o alelo T encontra-se fixado na raça Guzerá. Uma representação esquemática da distribuição dos SNPs encontrados ao longo do gene *ABCG2* está exposta na figura 1.

Oito dos dezessete SNPs aqui descritos encontram-se em exons, mas apenas um deles, o SNP g.48885A>C no exon 9, gera uma substituição na sequência de aminoácidos da proteína BCRP. Esta substituição equivale à troca de um ácido glutâmico por uma alanina (E322A) e tem potencial para repercussões funcionais importantes, pois causa a substituição de um amino ácido de carga negativa por um amino ácido hidrofóbico. Nas raças taurinas têm sido descrito apenas a variante E322 nesta posição. A comparação das sequências zebuínas com a sequência de referência taurina revelou ainda uma diferença na sequência da proteína BCRP entre raças. As raças taurinas apresentam serina na posição 397

da proteína, enquanto os zebuínos apresentam uma alanina nessa posição. Esta divergência deve-se a uma variação G>T entre as subespécies no códon determinante deste aminoácido. A comparação da sequência de nucleotídeos de bovinos e demais espécies ruminantes domésticas mostra que o aminoácido comum na posição 397 é uma alanina.

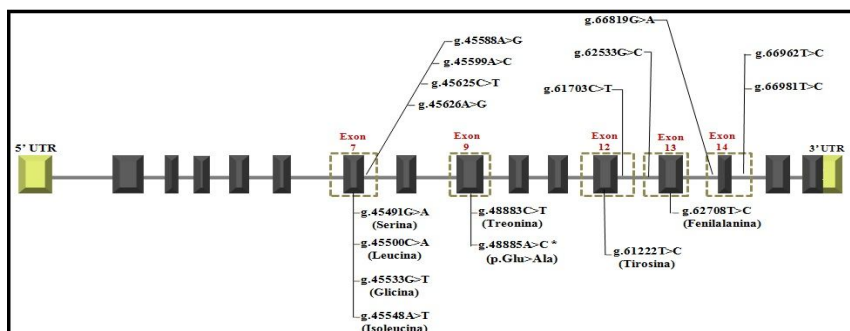


Figura 1. Estrutura do gene *ABCG2* e SNPs detectados nas raças Gir e Guzerá. Representação dos exons (retângulos pretos), regiões 5' e 3' UTR (retângulos amarelos) e regiões amplificadas por PCR (Caixas pontilhadas). Nomenclatura de polimorfismos exônicos abaixo de seu respectivo exon. Nomenclatura de polimorfismos em introns acima da representação estrutural do gene. \* Mutação não sinônimo.

No exon 14 do gene *ABCG2* foi observada a fixação da variante Y581, corroborando os resultados obtidos por Tantia et al. (2006) com raças zebuínas indianas. Vale ressaltar que o alelo fixado nas raças zebuínas é aquele que confere maior porcentagem de gordura e proteínas no leite de raças taurinas. A mutação g.45599A>C no intron 7, já havia sido descrita em raças taurinas por YUE et al. (2011) e indica a associação do gene *ABCG2* com a porcentagem de proteína no leite e contagem e células somáticas. Os resultados obtidos por estes autores sugerem a relação do gene *ABCG2* com a incidência de mastite, devido à sua atuação na proteção de várias células e tecidos contra endotoxinas e ainda reforçam a importância da análise de associação com polimorfismos em íntrons.

Embora existam estudos com o gene *ABCG2* em outras raças, não encontramos nenhum caso onde fossem relatados tantos polimorfismos como no presente estudo.

### Conclusões

O gene *ABCG2* corresponde a uma região genômica amplamente polimórfica em raças zebuínas apresentando mutações que devem ser estudadas quanto às implicações funcionais na expressão gênica e associação com o desempenho em características de importância econômica na produção de leite.

### Agradecimentos

O agradecimento dos autores destina-se a Embrapa Gado de leite pela concessão do material biológico utilizado neste estudo.

### Literatura citada

- COHEN-ZINDER, M.; SEROUSSI, E.; LARKIN, D.M. et al. Identification of a missense mutation in the bovine *ABCG2* gene with a major effect on the QTL on chromosome 6 affecting milk yield and composition in Holstein cattle. **Genome Research**, v.15, p.936-944, 2005.
- JONKER, J.W.; MERINO, G.; MUSTERS, S. et al. The breast cancer resistance protein BCRP (*ABCG2*) concentrates drugs and carcinogenic xenotoxins into milk. **Nature Medicine**, v.11, p.127-129, 2005.
- MILLER, S.A.; DYKES, D.D.; POLESKY, H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human cells. **Nucleic Acids Research**, v.16, p.1215, 1988.
- YUE, W.; FANG, X.; Zhang, C. et al. Two novel SNPs of the *ABCG2* gene and its associations with milk traits in Chinese Holsteins. **Molecular Biology Reports**, v.38, p.2927-2932, 2011.
- TANTIA, M.S.; VIJH, R.K.; MISHRA, B.P. et al. DGAT1 and *ABCG2* polymorphism in Indian cattle (*bos Indicus*) and buffalo (*Bubalus bubalis*) breeds. **BMC Veterinary Research**, v.7, 2006.