

Análise do polimorfismo no gene receptor de melatonina *MTRN1A* e suas correlações com características reprodutivas em búfalas (*Bubalus bubalis*)¹

Larissa Zetouni², Camila Urbano Braz³, Diércles Francisco Cardoso³, Rusbel Raul Aspilcueta Borquis³, Marcelo Cervini⁴, Humberto Tonhati⁵

¹Parte da dissertação de mestrado da primeira autora, financiada pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

²Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento Animal – FCAV/Unesp-Jaboticabal. Bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). e-mail: lzetouni@gmail.com

³Departamento de Zootecnia/FCAV/Unesp-Jaboticabal

⁴Professor adjunto do Departamento de Ciências Biológicas – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

⁵Professor Titular do Departamento de Zootecnia - FCAV/Unesp-Jaboticabal

Resumo: O principal fator ambiental que afeta a regulação da sazonalidade reprodutiva é o fotoperíodo, através da secreção de melatonina. O receptor de melatonina *MTRN1A* parece estar envolvido na regulação da sazonalidade reprodutiva. O objetivo do presente estudo foi a identificação de polimorfismos no gene *MTRN1A* bubalino e suas possíveis associações com as características idade ao primeiro parto e primeiro intervalo entre partos em búfalas. Foram coletadas amostras de pelo da cauda de 200 búfalas, e após a extração do DNA as amostras foram genotipadas pela técnica PCR-RFLP. Três amostras foram sequenciadas e foi encontrado um SNP na posição 72 do éxon 2 do gene *MTRN1A*, caracterizado pela substituição de um C por um T. As médias da idade ao primeiro parto e do primeiro intervalo entre partos foram avaliadas em um modelo misto, e os genótipos encontrados (CC, CT, TT) foram correlacionados com as características estudadas porém não foram significativos ($p > 0,05$).

Palavras-chave: *Bubalus bubalis*, melatonina, *MTRN1A*, SNP

Analysis of polymorphism in *MTRN1A* melatonin receptor gene and their correlations with reproductive traits in buffalo cows (*Bubalus bubalis*)

Abstract: The main environmental factor that affects reproductive seasonality regulation is the photoperiod, through melatonin secretion. Melatonin receptor *MTRN1A* seems to be involved in the seasonal breeding regulation. The aim of the present study was to identify polymorphisms in the *MTRN1A* buffalo gene and its possible associations with age at first calving and interval between first and second calving traits in buffalo cows. Samples of tail hair from 200 buffalo cows were collected, and after DNA extraction the samples were genotyped by PCR-RFLP. Three samples were sequenced and an SNP was found at position 72 of exon 2 in the *MTRN1A* gene, characterized by the substitution of an C for a T. The means from age at first calving and interval between first and second calving were evaluated by a mixed model, and the genotypes found (CC, CT, TT) were correlated with the traits studied but weren't significant ($p > 0,05$).

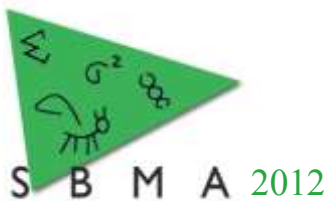
Keywords: *Bubalus bubalis*, melatonin, *MTRN1A*, SNP

Introdução

Os bubalinos, quando criados em localidades distantes da região equatorial, apresentam comportamento reprodutivo influenciado positivamente pela diminuição de horas de luz do dia. No Brasil, essa estacionalidade reprodutiva ocasiona uma concentração dos partos no outono e baixa eficiência reprodutiva durante o resto do ano, causando grande deficiência de leite no mercado e, consequentemente, de *mozzarella*, gerando possíveis prejuízos ao produtor e à cadeia leiteira.

O principal fator ambiental que afeta a regulação da sazonalidade reprodutiva é o fotoperíodo, através da secreção de melatonina (NOWAK & RODWAY, 1985). O receptor de melatonina *MTRN1A* parece estar associado a regulação da sazonalidade reprodutiva. Estudos com diversas raças de caprinos e ovinos tem demonstrado que um polimorfismo nesse gene resulta em animais com menor sazonalidade.

O estudo de polimorfismos em genes candidatos para um maior entendimento da sazonalidade reprodutiva é de extrema importância para melhorar a cadeia produtiva em búfalos. Sendo assim, o



IX Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

João Pessoa, PB – 20 a 22 de junho de 2012

objetivo desse trabalho foi a identificação de SNPs no gene receptor de melatonina *MTRNIA* e suas possíveis associações às características reprodutivas idade ao primeiro parto e primeiro intervalo entre partos.

Material e Métodos

Foram utilizadas amostras de pelo da cauda de 200 búfalas para extração de DNA, pela metodologia de Fenol-Clorofórmio-Álcool Isoamílico. As sequências dos *primers* utilizados para amplificação foram 5'- TGT GTT TGT GTT GAG CCT GG -3' e 5'- ATG GAG AGG GTT TGC GTT TA -3', descritas por MESSER et al. (1997).

Para a amplificação das regiões de interesse seguiu-se o protocolo da GoTaq® Colorless Master Mix (Promega), com um volume final de 15µL por reação, e os ciclos de amplificação seguiram o seguinte programa no termociclador: 94°C por 3 min, 94°C por 1 min, 68°C por 65 segundos e 72°C por um minuto (30 ciclos), e 72°C por 10 minutos.

O produto de PCR foi sequenciado a partir dos *primers* usando a técnica de terminação de cadeia por dideoxinucleotídeos (ddNTPs). Para a análise e identificação dos polimorfismos, as sequências obtidas foram analisadas através do programa CodonCode Aligner.

Para as análises de RFLP, seguiu-se o protocolo fornecido pelo fabricante da enzima (FastDigest® HpaI – Fermentas), com um volume final de 15µL.

As características idade ao primeiro parto e intervalo entre partos foram avaliadas em um modelo misto, utilizado-se o procedimento MIXED do SAS (2000). Os dados foram analisados com o seguinte modelo linear: $y = \mu + \text{Touro} + GC + b_1(I_{ijk} - \bar{I}) + b_2(I_{ijk} - \bar{I})^2 + \text{gen} + e$

Onde y = variável dependente (idade ao primeiro parto e primeiro intervalo entre partos); μ = média geral para a população para as características em estudo; Touro = efeito aleatório do touro; GC = efeito fixo de grupo contemporâneo formado pelo ano e estação de parto (água e seca) para primeiro intervalo entre partos e ano e estação de nascimento para idade ao primeiro parto; I_{ijk} = efeito da idade da vaca ao parto como covariável; \bar{I} = média da covariável idade; b_1 = coeficiente da regressão linear para idade da vaca ao parto; b_2 = coeficiente quadrático para idade da vaca ao parto; gen = efeito fixo do genótipo; e = erro aleatório.

As médias dos valores para os diferentes genótipos foram comparadas utilizando-se o teste de Tukey ($P < 0,05$).

Resultados e Discussão

Os *primers* amplificaram a região de interesse, resultando em um fragmento de 824 pb, localizado no éxon 2 do gene *MTRNIA*. Os produtos de PCR foram genotipados por RFLP, e os genótipos encontrados foram TT (824 pb), CT (824 pb, 745 pb e 79 pb) e TT (745 pb e 79 pb). Foram calculadas as frequências genotípicas e a população encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg pelo teste de χ^2 a 5%.

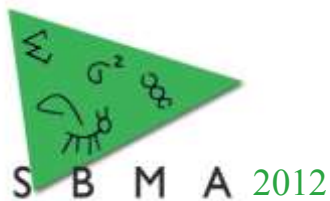
Três produtos de PCR, um de padrão de clivagem, foram sequenciados. O fragmento completo do gene apresentou 802 nucleotídeos e foi detectado um polimorfismo do tipo SNP na posição 82, caracterizado pela substituição de uma citosina por uma timina.

Foram analisadas as possíveis correlações entre o SNP encontrado e as características idade ao primeiro parto e primeiro intervalo entre partos, porém não foram observadas diferenças estatísticas significantes entre os genótipos, ao nível de 5%.

PALUDO et al. (2011) estudaram o gene *MTRNIA* para avaliar seus possíveis efeitos na idade à puberdade em búfalas Mediterrâneas criadas na Itália, porém seus resultados não foram significativos. Entretanto, estudos com ovelhas da raça Dorset (MATEESCU et al., 2009; MURA et al., 2010) demonstraram que o genótipo do gene *MTRNIA* influencia a puberdade e diminui o intervalo entre o primeiro e o segundo parto.

Conclusões

No presente estudo, avaliou-se a presença de polimorfismos no gene bubalino do receptor de melatonina *MTRNIA*, previamente estudado e associado à sazonalidade reprodutiva em búfalas. O SNP



IX Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

João Pessoa, PB – 20 a 22 de junho de 2012

encontrado foi correlacionado com as características idade ao primeiro parto e primeiro intervalo entre partos, porém os resultados não foram significativos. Entretanto, estudos posteriores se fazem necessários para uma melhor compreensão do gene da melatonina e seus receptores nas funções reprodutivas dos búfalos. Devido a grande importância da melatonina na regulação da sazonalidade reprodutiva, o estudo desse gene se justifica para que possamos entender melhor sua influência sobre características reprodutivas na espécie bubalina.

Literatura citada

MATEESCU R. G.; LUNSFORD, A. K.; THONNEY, M. L. Association between melatonin receptor 1A gene polymorphism and reproductive performance in Dorset ewes. **Journal of Animal Science**, v. 87, p. 2485-2488, 2009.

MESSER, L. A.; WANG, L.; TUGGLE, C. K.; YERLE, M.; CHARDON, P.; POMP, D.; WOMACK, J. E.; BARENDSE, W.; CRAWFORD, A. M.; NOTTER, D. R.; ROTHSCHILD, M. F. Mapping of the melatonin receptor 1a (*MTNR1A*) gene in pigs, sheep and cattle. **Mammalian Genome**, v. 8, p. 368-370, 1997.

MURA, M. C.; LURIDIANA, S.; VACCA, G. M.; BINI, P. P.; CARCANGIU, V. Effect of genotype at the *MTNR1A* locus and melatonin treatment on first conception in Sarda ewe lambs. **Theriogenology**, v. 74, p. 1579-1586, 2010.

NOWAK, R.; RODWAY, R. G. Effect of intravaginal implants of melatonin on the onset of ovarian activity in adult and prepubertal ewes. **Journal of Reproduction & Fertility**, v. 74, p. 287-293, 1985.

PALUDO, M.; MURA, M. C.; LURIDIANA, S.; PAZZOLA, M.; DAGA, C.; VACCA, G. M.; BUA, S.; BODANO, S.; SANNA, G. A.; CARCANGIU, V. Genotype of Melatonin Receptor MT1 (*MTNR1A*) and Puberty in Mediterranean Italian Buffalo. **Agriculturae Conspectus Scientificus**, v. 76, n. 3, p. 157-160, 2011.

SAS INSTITUTE. User's guide. Cary: SAS Institute, 2000.