

VIII Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Maringá, PR – 01 e 02 de julho de 2010

Melhoramento Animal no Brasil: UMA VISÃO CRÍTICA

Comparação da presença de polimorfismo no gene GDF-9 em diferentes raças de ovinos¹

Adriana Bagatoli², Odair Scatolin Rossafa Garcia⁴, Liegie Alher Marques⁶, Eliane Gasparino³, Maria Amélia Menck Soares⁵, Francisco de Assis Fonseca de Macedo³

¹Parte da dissertação de mestrado do primeiro autor

²Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia – UEM/Maringá. e-mail: adrianabagatoli@hotmail.com

³Professor do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia – UEM/Maringá. e-mail: egasparino@uem.com

⁴Aluno do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia – UFRRJ/Seropédica.

⁵Professor do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia – UFRRJ/Seropédica.

⁶Graduando do Curso de Zootecnia – UEM/Maringá.

Resumo: Nos ovinos o fator de crescimento e diferenciação nove expresso nos ovócitos é fundamental para a foliculogênese em sua fase inicial. Uma mutação pontual neste gene (GDF9) pode estar correlacionada com o aumento na taxa de ovulação e consequentemente com a sua prolificidade. O objetivo neste trabalho foi avaliar a existência de polimorfismos no gene GDF-9 em quatro raças de ovinos. Para isso, foi utilizada a técnica de PCR-RFLP para amplificar um fragmento de 420 pb do gene GDF9 e subsequente restrição com a enzima *TpsRI*. A análise foi feita em gel de poliacrilamida a 12% corado com nitrato de prata. Foi possível identificar a presença de variação alélica deste gene em animais da raça Santa Inês, sendo que estes animais caracterizaram-se por heteroziguidade. Ao contrário, as outras raças tiveram ausência para o polimorfismo e apareceram apenas homozigotos para o alelo selvagem. Isso sugere que animais Santa Inês possuem maior frequência na taxa de ovulação e que os SNPs no GDF-9 para esta raça poderão ser utilizados como marcadores moleculares no melhoramento genético para tais populações.

Palavras-chave: fator de crescimento e diferenciação, prolificidade em ovinos, taxa de ovulação

Comparison of the presence of a polymorphism in GDF-9 gene in different sheep breeds

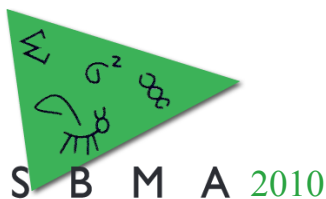
Abstract: In sheep the growth and differentiation factor nine express in oocyte it's fundamental for the folliculogenesis in the starting fase. A punctual mutation in this gene (GDF9) can be correlated with the raise in the ovulation rate and consequently of your prolificacy. The objective of this study was to evaluate the existence of polymorphisms in the GDF-9 gene in four sheep breeds. For this, it was used the PCR-RFLP technique to amplify a 420 pb fragment of GDF9 gene and subsequent restriction with the *TpsRI* enzyme. It has been made a gel analyze of polyacrylamide at 12% stained with silver nitrate. It was possible to identify the presence of allelic variation of this gene in animals of Santa Ines, and these animals were characterized by being heterozygous. Unlike the other races were absent for polymorphism and appeared only homozygous for the wild allele. This suggests that SI breed have a higher frequency in the ovulation rate and that the SNPs in the GDF-9 for this race could be used as molecular markers in breeding for such populations.

Keywords: growth and differentiation factor, prolificacy in sheeps, ovulation rate

Introdução

A raça de ovinos Santa Inês (SI) por possuir alta capacidade de adaptação, assim como alta eficiência reprodutiva, tornou-se uma importante fonte na produção de proteínas, através do comércio da carne, especialmente em regiões de clima seco, como o Nordeste (Madruza et al., 2005). Por serem comuns nascimentos de partos múltiplos em SI, pesquisas relacionadas à taxa de prolificidade têm sido investigadas a fim de se tornar um importante meio para programas de seleção (Castro et al., 2006).

Logo, muitos pontos de mutações têm sido identificados em dois genes de fatores de crescimento que são expressos nos ovócitos, o gene BMP15 e o GDF9 (Mcnatty et al., 2006), e que apresentam grande influência sobre as fases iniciais da foliculogênese, na proliferação das células da granulosa e da teca em mamíferos. O gene GDF9 (fator de diferenciação e crescimento – 9) apresenta dois éxons, sendo que o segundo é constituído por 70% da sequência que codificará a proteína e formará o hormônio ativo



VIII Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Maringá, PR – 01 e 02 de julho de 2010

Melhoramento Animal no Brasil: UMA VISÃO CRÍTICA

(Castro et al., 2006). Uma mutação nesse gene é capaz de aumentar as taxas de prolificidade, promovendo partos duplos ou triplos. Por essa razão, o objetivo desse trabalho foi comparar a presença do polimorfismo que atua nas taxas de ovulação em ovinos, no gene GDF-9, na raça Santa Inês, e em outras raças em que partos múltiplos são menos comuns.

Material e Métodos

Foram utilizados 46 ovinos (*Ovis aries*) das raças Santa Inês, Dorper, White Dorper e Ile de France para a comparação da presença de polimorfismo, pertencentes a rebanhos comerciais na região de Maringá -PR.

O DNA genômico foi obtido das células brancas do sangue por meio de extração com CTAB. Essa técnica foi feita, com base na publicação de Dellaporta et al. (2000) apresentando algumas alterações. O isolamento foi feito através da adição de brometo hexadeciltrimetilamônio (CTAB) nas amostras sanguíneas. Em cada amostra de 100 µL de leucócitos foram acrescidos 500 µL do tampão CTAB a 2% em tubos de 1,5 mL. Essas amostras foram incubadas em banho-maria a 65°C por uma hora com agitações eventuais. Em seguida, foram adicionados 500 µL de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1) com posterior agitação vigorosa.

As amostras foram levadas a centrifuga por 10 minutos a 9.285 g. Em tubos limpos, o sobrenadante foi transferido e a precipitação do DNA ocorreu com a adição de 350 µL de isopropanol. Essa etapa foi seguida por resfriamento a 4°C durante 30 minutos e posterior centrifugação a 11.142 g durante 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado duas vezes em etanol 75%, com centrifugação a 11.142 g por dois minutos entre as duas lavagens. Após a evaporação, as amostras de DNA foram hidratadas em 50 µL de água ultra-pura. O DNA genômico extraído foi armazenado a -20°C.

A partir da técnica da PCR (*Polymerase Chain Reaction – reação da polimerase em cadeia*) a amplificação do fragmento correspondente ao gene GDF-9 foi realizado em um volume contendo os *primers*, desoxirribonucleotídeos (dNTPs), MgCl₂, KCl, Tris-HCl, *Taq* DNA Polimerase, DNA genômico e água ultra-pura, finalizando em cada amostra 20 µL. O programa consistiu na etapa inicial de desnaturação, acompanhada por desnaturação das fitas para o anelamento dos *primers* e etapa final de extensão das fitas.

O produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) a 12% corado com nitrato de prata (solução fixadora de ácido acético, solução de nitrato de prata e solução reveladora de hidróxido de sódio).

Para a genotipagem dos animais, os produtos de PCR foram digeridos com a enzima de restrição *TpsRI*. A reação de digestão ocorreu em um volume final de 10 µL.

Resultados e Discussão

A enzima de restrição *TpsRI* corta a região do gene GDF-9, para um alelo do tipo selvagem, em apenas um ponto e corta duas vezes a sequência do alelo mutante produzindo três fragmentos, ou quatro se for um heterozigoto. A digestão da PCR pela enzima produziu fragmentos de 85, 130, 205 e 290 pares de base (pb) para os animais da raça Santa Inês. Nas raças, Dorper, White Dorper e Ile de France, a enzima cortou a região em apenas dois fragmentos, 130 e 290 pb. Logo, isso revelou que em SI o polimorfismo foi caracterizado pelos genótipos heterozigotos dos animais, ao contrário das demais raças que apresentaram o genótipo selvagem e se caracterizaram por ausência de polimorfismo (Figura 1).

Segundo Castro et al. (2006), a mutação no gene GDF-9 é a responsável pelo aumento da taxa de prolificidade nas raças européias de ovinos, e que esta mutação também encontrada na raça brasileira Santa Inês poderá ter um papel fundamental no aumento de sua taxa de ovulação. Visto que é comum a ocorrência de partos múltiplos nesta raça, é provável que a existência do polimorfismo esteja intimamente ligada com os resultados positivos.

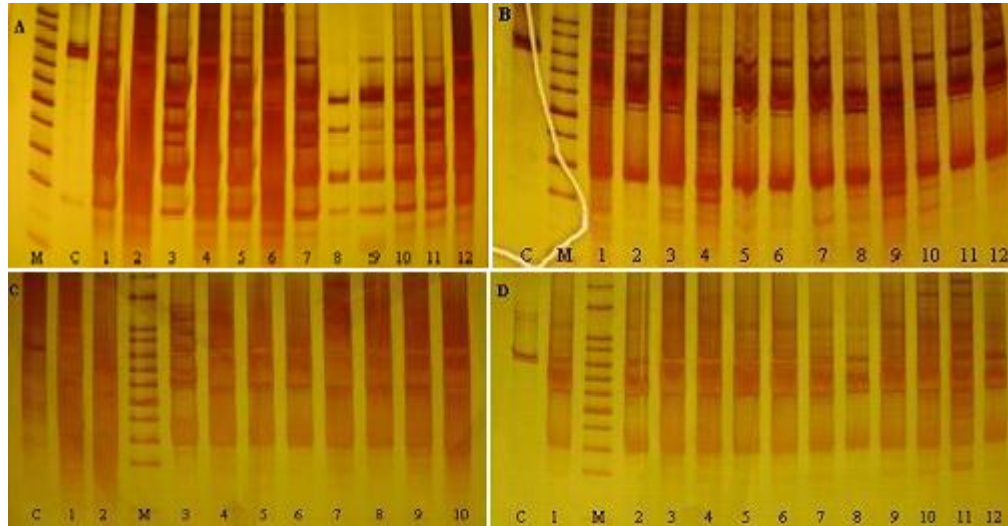


Figura 1 Gel de poliacrilamida a 12% corado com nitrato de prata, indicando a presença ou ausência de polimorfismos nas raças. M = (50 pb) padrão de peso molecular; C = animal controle ; A= Santa Inês; B = Dorper; C= White Dorper; D= Ile de France

Conclusões

Neste trabalho encontramos polimorfismos na raça Santa Inês e ausência de variação alélica nas raças Dorper, White Dorper e Ile de France. É possível que a raça SI tenha ancestrais comuns com as européias, permitindo que a variação no gene fosse transmitida via cruzamentos.

Por outro lado, a raça Ile de France, que é originária da França, ou seja, que é européia, não apresentou a ocorrência do polimorfismo, assim como as raças Dorper e White Dorper que foram desenvolvidas na região da África do Sul. A ausência do polimorfismo ocorreu mesmo estas raças sendo caracterizadas por apresentarem alta fertilidade.

Portanto, serão necessários mais estudos para avaliar o ponto de origem da mutação assim como a frequência em que ocorre o polimorfismo nas diversas raças.

Literatura citada

CASTRO, E. A.; LOPEZ, I. M. R.; LIMA, A. et al. Characterization of a new SNP in the Growth and Differentiation Factor 9 (GDF-9) gene, specific for the Brazilian Santa Inês sheep. In: **8th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production**, Belo Horizonte, Brasil, agosto, p.13-18, 2006.

DELLAPORTA, S. L.; WOOD; HICKS, J. B. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, v. 1(14): p. 19-21, 1983.

MADRUGA, M. S.; SOUSA, W. H.; ROSALES, M. D.; CUNHA, M. G. G.; RAMOS, J. L. F. Qualidade da carne de cordeiros Santa Inês terminados com diferentes dietas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34(1), p.309-315, 2005.

MCNATTY, K. P.; LAWRENCE, S.; GROOME, N. P.; MEERASAHIB, M. F. et al. Oocyte signalling molecules and their effects on reproduction in ruminants. **Reproduction, Fertility and Development**, v.18(4), p.403-412, 2006.