

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

**Polimorfismos no gene JY-1 e suas associações com dias para o parto e reconcepção de primíparas em bovinos da raça Nelore<sup>1</sup>**

Gregório Miguel Ferreira de Camargo<sup>2</sup>, Raphael Bermal Costa<sup>2</sup>, Lucia Galvão de Albuquerque<sup>3</sup>, Luciana Correia de Almeida Regitano<sup>4</sup>, Fernando Baldi<sup>3</sup>, Humberto Tonhati<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Parte da tese de doutorado do primeiro autor. Financiado pela Fapesp

<sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento Animal – FCAV/Unesp Jaboticabal-SP. Bolsista Fapesp. E-mail: gregoriocamargo@hotmail.com

<sup>3</sup>Departamento de Zootecnia – FCAV/Unesp-Jaboticabal-SP

<sup>4</sup>Empraba Pecuária Sudeste – São Carlos-SP

**Resumo:** Proteínas da secreção uterina têm grande importância na recepção do embrião no útero. A proteína JY-1 tem sua expressão no óvulo e está associada à foliculogênese e ao desenvolvimento inicial do embrião podendo afetar as características reprodutivas. Marcadores moleculares podem ser inseridos na avaliação genética a fim de melhorar a acurácia de predição. 385 fêmeas bovinas da raça Nelore foram estudadas para as regiões dos éxons um e dois do gene JY-1 pela técnica de PCR-sequenciamento. Foram descobertos 17 polimorfismos. Após as análises de desequilíbrio de ligação, foram feitos testes de associação com oito SNPs com as características de dias para o parto e reconcepção de primíparas. Dois SNPs foram significativos a característica de dias para o parto. Esses SNPs estão localizados em regiões não-codificantes, podendo alterar sítios de ligação/produção de miRNAs afetando a produção desse transcrito ou de outros transcritos. Acredita-se que essas regiões nesse gene podem ser importantes de serem analisadas a fim de entender, quantificar e validar a influência do mesmo nas características reprodutivas.

**Palavras-chave:** PCR-sequenciamento, regiões não-codificantes, SNP

**Polymorphisms in JY-1 gene and their association with days to calving and subsequent rebreeding in Nelore cattle.**

**Abstract:** Histotroph proteins have a big importance in the embryo reception in uterus. The JY-1 protein is expressed in the ovum and it is associated to the folliculogenesis and to the initial development of the embryo, it may affect the reproductive traits. Molecular markers may be included in the genetic evaluation in order to improve the prediction of accuracy. A total of 385 Nelore females were studied to the regions of exon 1 and 2 of JY-1 gene by PCR-sequencing. A total of 17 polymorphisms were detected. After the disequilibrium linkage analyses association tests were done with eight SNPs with days to calving and subsequent rebreeding. Two SNPs were significant to the trait days to calving. These SNPs were located in non-coding regions and may modify binding/production sites of miRNA affecting the production of this transcript or other transcripts. These regions in this gene may be important to be analyzed in order to understand, quantify and validate the influence of it in the reproductive traits.

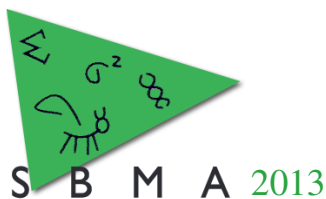
**Keywords:** PCR-sequencing, non-coding regions, SNP

### Introdução

Mullen et al. (2012), em estudos de proteômica, ressaltaram a importância de proteínas da secreção uterina durante o ciclo estral. Elas têm como função adequar o ambiente uterino para a recepção do embrião e ajudar no crescimento do mesmo. A JY-1 é uma proteína presente no óvulo e é de origem materna. Ela influencia na foliculogênese e na manutenção inicial do embrião, podendo afetar as características reprodutivas (Bettegowda et al. 2007).

O conhecimento de genes que afetam determinada característica facilita a seleção genômica, pois é difícil ponderar entre um modelo mais conservador (muitos SNPs, mas potencialmente falsos) ou menos conservador (poucos SNPs e muito significativos) (Fortes et al., 2010).

de Camargo et al. (2013) fizeram um estudo de busca por polimorfismos nos éxons do gene JY-1 em novilhas da raça Nelore e encontraram 18 polimorfismos. Assim, o objetivo desse estudo foi verificar a influência de alguns polimorfismos previamente detectados para o gene JY-1 com dias para o parto (DPP) e reconcepção de primíparas (REC) em fêmeas bovinas da raça Nelore.



## X Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Uberaba, MG – 18 a 23 de agosto de 2013

### Material e Métodos

As extrações de DNA das amostras de folículo piloso coletadas foram realizadas pela metodologia de Fenol-Clorofórmio-Álcool Isoamílico de 385 fêmeas da raça Nelore nascidas no ano de 2008.

Foram utilizados dois pares de *primers* para amplificar as regiões dos éxons um e dois do gene JY-1 como descrito em de Camargo et al. (2013).

As reações de amplificação tinham um volume final de 15µL, contendo 1,5µL de DNA (105 ng), 1,5µL de cada um dos *primers* (15 pM), 7,5µL de GoTaq Colorless Master Mix e 4,0 de água (nuclease free). Os ciclos de amplificação seguiram em termociclador MasterCycler Gradient 5331 (Eppendorff®, Alemanha, 2005) sob a programação: desnaturação a 95°C por 5 min, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 min, pareamento a temperatura descrita em de Camargo et al. 2013 por 1 min, extensão a 72°C por 1 min e extensão final a 72°C por 5 min.

O produto de PCR foi sequenciado a partir de um dos *primers* (*forward* ou *reverse*) usando a técnica de terminação de cadeia por dideoxinucléotídeos (ddNTPs) utilizando o ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, (Applied Biosystems) em um sequenciador automático ABI 3730 XL (Applied Biosystems).

Para a análise e identificação dos polimorfismos, as sequências obtidas foram analisadas e visualizadas com os programas CodonCode Aligner disponível no site (<http://www.codoncode.com/aligner/download.htm>).

O desequilíbrio de ligação entre os SNPs foi estimado com o uso do programa computacional Plink (disponível no site <http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink/>).

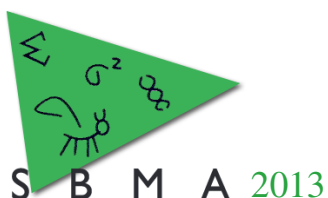
Para as análises de variância da característica de dias para o parto e reconcepção de primíparas foram utilizados os aplicativos PROC MIXED e PROC GLIMMIX do aplicativo do pacote estatístico SAS 9.2 respectivamente para as características e usados 226 animais. O modelo estatístico usado continha os fixos de grupo de contemporâneo (definido como grupos de manejo de nascimento, desmama e sobreano e estação de nascimento para DPP e; estação de nascimento da vaca, sexo do bezerro e ano do parto da primeira cria para REC), touro (efeito aleatório) e dos oito SNPs estudados concomitantemente (efeitos fixos). No modelo, foram usadas as covariáveis de idade, em dias, da fêmea na entrada da estação de monta (efeito linear) e período de descanso em dias (efeito linear) para as características DPP e REC, respectivamente.

### Resultados e Discussão

Nos fragmentos amplificados das 385 fêmeas estudadas, foram encontrados 17 polimorfismos, sendo que 14 desses polimorfismos haviam sido descritos por de Camargo et al. (2013) na caracterização das regiões exônicas do gene (-107, -91, -45, 1, 202, 12.972, 12.999, 13.038, 13.043, 13.048, 13.084, 13.135, 13.136 e 13.149) e três são novos (130, 392 e 13050).

As frequências alélicas e genóticas foram calculadas por contagem. O desequilíbrio de ligação foi feito a fim de avaliar quais polimorfismos segregavam juntos (dados não mostrados). Após a construção dos grupos de SNPs em desequilíbrio, escolheu-se o de melhor frequência genotípica do grupo para associação com as características. Assim, usaram-se oito SNPs como efeitos fixos concomitantemente no modelo estatístico.

Os dados mostram que dois SNPs foram significativos para a característica DPP (Tabela 1).



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

Tabela 1. Valores de p dos SNPs para as características estudadas.

SNPs/características	DPP	REC
-91	0,24	0,76
1	<b>0,05</b>	0,29
130	0,25	0,39
392	<b>0,04</b>	0,19
12.999	0,09	0,35
13.043	0,56	0,87
13.050	0,57	0,13
13.084	0,42	0,96

Esses SNPs estão localizados no éxon 1 (1) e íntron 1 (392). Apesar de o SNP 1 estar localizado no éxon 1, ele não é codificante, tratando-se portanto de uma região 5'UTR. Esses SNPs podem estar em desequilíbrio com outro SNP causal, podem alterar sítios de ligação de miRNAs (SNP 1) afetando a produção do transcrito ou sítios de produção de miRNAs (SNP 392) que regulam a expressão de outros transcritos.

Não há dados relacionando SNPs no gene JY-1 com as características estudadas. Há outros estudos de associação de polimorfismos do mesmo gene com ocorrência de prenhez precoce a 8% apresentados por de Camargo et al. (2012). Apesar de os SNPs previamente estudados não serem os mesmos, a característica de DPP é indicadora de precocidade o que mostra que esses resultados já sinalizavam a influência do gene em características reprodutivas.

#### Conclusões

Foram encontrados SNPs no gene JY-1 significativos para a característica de dias para o parto em fêmeas da raça Nelore. Esses SNPs estão em regiões não-codificantes, indicando que, em características indicadoras de precocidade sexual, essas regiões nesse gene podem ser importantes de serem analisadas a fim de entender, quantificar e validar a influência do mesmo nas características reprodutivas.

#### Agradecimentos

Agradece-se à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) pelo auxílio regular e bolsa de estudos do primeiro autor.

#### Literatura citada

BETTEGOWDA, A. et al JY-1, an oocyte-specific gene, regulates granulosa cell function and early embryonic development in cattle **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.104, p.17602-17607, 2007.

BRUMATTI, R. C., FERRAZ, R. C., ELER, J. P. Desenvolvimento de índices de seleção em gado de corte sob enfoque de um modelo bioeconômico. **Archivos de Zootecnia**, v.60, p. 205-213, 2011.

DE CAMARGO, G.M.F. et al. Characterization of the exonic regions of the JY-1 gene in zebu cattle and buffaloes. **Reproduction in Domestic Animals**, p.1-5, 2013

DE CAMARGO, G.M.F. et al. First polymorphisms in JY-1 gene in cattle (*Bos taurus indicus*) and their association with sexual precocity and growth traits. **Molecular Biology Reports**, v.39, p.10105-10109, 2012.

FORTES, M. R. S. et al. Association weight matrix for the genetic dissection of puberty in beef cattle. **PNAS**, v.107, p. 13642-13647, 2010.

MULLEN, M. P. et al. Proteomic characterization of histotroph during the preimplantation phase of the estrous Cycle in cattle. **Journal of Proteome Research**, v.11, p.3004-3018, 2012.