

Glenda Mônica Luna de Holanda

**LEVANTAMENTO DE POLIMORFISMOS DOS GENES BMPR-1B E
BMP-15 EM OVINOS DAS RAÇAS SANTA INÊS E MORADA NOVA
DO SEMI-ÁRIDO NORDESTINO BRASILEIRO**

RECIFE - PE
2009

Glenda Mônica Luna de Holanda

**LEVANTAMENTO DE POLIMORFISMOS DOS GENES BMPR-1B E
BMP-15 EM OVINOS DAS RAÇAS SANTA INÊS E MORADA NOVA
DO SEMI-ÁRIDO NORDESTINO BRASILEIRO**

Tese apresentada no Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Veterinária - Área: Reprodução Animal
Orientadora: Profa. Dra. Áurea Wischral

RECIFE – PE
2009

FICHA CATALOGRÁFICA

H722i Holanda, Glenda Mônica Luna de
Levantamento de poliformismos dos genes BMP1
IB e BMP-15 em ovinos das raças Santa Inês e Morada Nova do semi-árido nordestino brasileiro
/ Glenda Mônica Luna de Holanda. -- 2009.
59 f. : il.

Orientadora : Áurea Wischral
Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco. Departamento de Medicina Veterinária.
Inclui bibliografia.

CDD 574.873 2

1. Booroola
 2. Galloway
 3. Ovino
 4. Raça Santa Inês
 5. Genética molecular
- I. Morada Nova
 - II. Título

À nossa querida, Expedita Pires Ferreira (Tia), por sua trajetória de luta, dedicação e imenso amor, exemplos constantes em minha vida.

in memoriam

Dedicatória.....

A Deus, por sua presença iluminando sempre os meus caminhos;
Aos meus amados pais, Onildo e Ivanilde, e irmãos, Valéria, Eduardo, Bruno e Érica Luna de Holanda, por todo imenso e constante apoio e amor recebidos;

À minha querida filha, Amanda, pelas alegrias constantes que coloca em meus dias;

Aos meus lindos sobrinhos, João Vítor, Maria Eduarda, Mariana e Sofia.....

AGRADECIMENTOS

Ao Casal, Profa. Aurea Wischral e Prof. Manoel Adrião, pela excelente orientação e presença efetiva, exercidos com dedicação a cada obstáculo, ou ganho, em todos os passos do desenvolvimento desse trabalho. Assim como pelo exemplo de profissionalismo na área de pesquisa em Ciências Agrárias, fazendo com que os conhecimentos adquiridos no dia a dia dos trabalhos, executados em equipe, tenham se tornado algo prazeroso a ser compartilhado com simplicidade e alegria.

Aos colegas e futuros colegas de profissão, presentes no dia a dia do Laboratório FAMA da UFRPE, Adriano, Arthur, Clarissa, Daniela, Edvaldo, Eleonora e Mariana, pela agradável convivência no processo de mútua ajuda e crescimento profissional durante a execução dos trabalhos de pesquisa. Sendo este agradecimento dedicado especialmente, ao bolsista de Iniciação Científica, Diogo Manoel Farias da Silva por seu compromisso e presença em diversas etapas do desenvolvimento desse trabalho.

A Dra. Diana Scione pela oportunidade que abriu para que pudesse conhecer melhor os programas executados pelo LANAGRO. Assim como aos colegas do Ministério da Agricultura, Dra. Vânia L. A. Santana, Dra. Marcília Maria A. de Souza, Dr. Paulo Foerst, por terem me permitido realizar um treinamento relativo a técnicas moleculares aplicadas à Defesa Sanitária Animal, possibilitando assim um excelente ganho de conhecimentos, fundamental à execução desse trabalho. Bem como, para um entendimento mais amplo nessa área de atuação tão importante da nossa medicina veterinária. Em especial, agradeço à Dra. Vânia L. A. Santana por sua alegria ao compartilhar os seus conhecimentos e ao incentivar e perceber os ganhos profissionais dos seus amigos.

Aos produtores rurais, Arcônio Lins Neto, Érica Paes Barreto Xavier de Moraes, Jânio José de Brito Cavalcanti Jr, Romero Queiroz e José Otávio. À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Caprinos e Ovinos / Sobral – CE e ao Instituto Agrônômico de Pernambuco - IPA / Serra Talhada - PE, por possibilitarem a colheita de amostras em seus rebanhos e em propriedades das suas regiões, abrindo essa valiosa oportunidade para a realização dessa pesquisa. Também Agradeço ao Dr. Carlos José Hoff de Souza, por ter cedido gentilmente as amostras para os controles-positivo.

Aos colegas do Instituto Agrônômico de Pernambuco, Dr. Venésio Felipe dos Santos pela contribuição na análise estatística e, aos Drs. Ivan Ferraz e Mário de Andrade Lira pelo incentivo, compreensão e constante apoio que me permitiram a elaboração desse trabalho.

Aos Drs. Prof Éderson Akio Kido, Valesca Pandolfi e Pedrane K. A. Barbosa, do Laboratório Positiva da UFPE, pela ajuda efetiva e esclarecimentos em alguns passos na execução de técnicas da Biologia Molecular, envolvidas nesse experimento.

Aos professores do Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE, os quais sempre estiveram disponíveis e solícitos, esclarecendo as minhas tantas dúvidas e transmitindo seus conhecimentos com o profissionalismo, dedicação e o sacerdócio constante da função PROFESSOR. Por tanto, agradeço a todos os meus mestres, em nome do Prof. Lêucio Câmara Alves.

Aqueles amigos que fazem a diferença na área da Reprodução Animal, sempre receptivos, e sensíveis às nossas necessidades de apoio, Alcir L. de Carvalho Filho, Joana D'Arc da R. Alves e D. Sônia Maria D. de Lima.

Aos professores, e amigos, Márcia Brayner Paes Barreto, Jacinta Eufrásia Brito Leite e Roberto Soares de Castro, que me receberam de braços abertos, no meu retorno a essa Universidade, fazendo com que eu me sentisse em casa e abrindo os caminhos para a realização desse trabalho.

Às minhas queridas e muito amigas do grupo *Regristas*, que acompanharam a minha trajetória nesse trabalho, Adriana, Patrícia, Elisabete, Daniela e, em especial, Andréa Q. Stainer a qual contribuiu com suas sugestões de bióloga e tradutora.

Às mais novas e queridas amigas que fiz durante o decorrer do curso, ficando em meu coração, Sandra Regina D. Monteiro e Maria da Conceição G. de Lima. Amigas fraternas, construídas pela força, cumplicidade no querer aprender e constante apoio, em várias etapas da minha formação, para esse meu novo grau alcançado.

LISTA DE TABELA – Experimento I

Tabela 1 - Número médio do tamanho da ninhada conforme o genótipo encontrado, para o gene <i>FecB</i> , em ovelhas da raça Santa Inês e Morada Nova.....	36
--	----

LISTA DE TABELA – Experimento II

Tabela 1 - Número médio de crias/parto para as raças Morada Nova e Santa Inês com histórico de partos gemelares.....	52
--	----

LISTA DE FIGURAS – Experimento I

Figura 1 - Fragmentos obtidos pela técnica PCR-RFLP para o gene Booroola em fêmeas prolfícas da raça Santa Inês.....	37
Figura 2 – Resultados de PCR-RFLP. Amostras após digestão com enzima <i>Ava II</i> em animais da raça Santa Inês.....	37

LISTA DE FIGURA – Experimento II

Figura 1- Resultado de PCR – RFLP para <i>FecX^G</i> digerido com endonuclease <i>Hinf I</i>	53
--	----

Levantamento de polimorfismos dos genes *BMPR -1B* e *BMP-15* em ovinos das raças Santa Inês e Morada Nova do semi-árido nordestino brasileiro

Glenda Mônica Luna de Holanda

Orientadora: Áurea Wischral

RESUMO - A identificação de genes que influenciam na prolificidade de ovinos proporciona a abertura de um caminho promissor para a pesquisa; este, quando somado a outras medidas, poderá resultar ganho em produtividade e possibilitar a investigação de outros fatores envolvidos na dinâmica folicular dessa espécie. Este estudo objetivou pesquisar a existência de mutações Booroola (*FecB*) e Galway (*FecX^G*) através da técnica PCR-RFLP, em ovelhas das raças Morada Nova e Santa Inês, com histórico de prolificidade. Da raça Santa Inês, foram analisadas 393 fêmeas com histórico de uma cria por parto e 181 com duas ou mais crias por parto além de 23 machos. Outras 282 fêmeas foram da raça Morada Nova, das quais, 170 constituíram o grupo de uma cria por parto e outras 112 fêmeas compuseram o grupo de duas ou mais crias por parto. O sangue coletado através de punção da jugular foi usado para obtenção dos leucócitos e extração do DNA pela técnica fenol-clorofórmio. Os genes de interesse para estudo das mutações *FecB* e *FecX^G* foram amplificados a partir de *primers* específicos e submetidos à ação das endonucleases Ava II e Hinf I, respectivamente. A análise dos fragmentos obtidos em gel de agarose revelou a existência do gene *FecB* em 1,04% das fêmeas da raça Santa Inês com histórico de duas, ou mais, crias por parto, não sendo observado nas fêmeas Morada Nova. A mutação *FecX^G* não foi observada em nenhum dos animais estudados. Conclui-se que a mutação *FecB*, embora presente em fêmeas Santa Inês, está em baixa frequência e não é uma boa ferramenta para seleção de ovelhas prolíficas; ademais, a prolificidade observada nas raças Santa Inês e Morada Nova não está relacionada com as mutações *FecB* ou *FecX^G*.

Palavras chave: Booroola, Galway, ovino, gene da prolificidade

Investigation of polymorphisms of genes BMPR -1B and BMP-15 among ‘Santa Inês’ and ‘Morada Nova’ sheep from Northeast Brazil's semi-arid region

ABSTRACT – Identifying genes that influence sheep prolificity opens up a promising research path; when added to other measures, this procedure may result in greater productivity and allow the investigation of other factors involved in the follicular dynamics of these animals. The aim of the present study was to search for Booroola (*FecB*) and Galway (*FecX^G*) mutations using the PCR-RFLP technique on sheep of the “Santa Inês” and “Morada Nova” breeds with a history of prolificity. Among the “Santa Inês” breed, 393 females with a history of single offspring per delivery and 181 with two or more offspring per birth were analyzed, along with 23 males and 282 females of the “Morada Nova” breed (170 with one offspring per birth and 112 with two or more offspring). Blood collected through a jugular puncture was used to obtain leukocytes and extract DNA using the phenol-chloroform technique. Genes of interest for studying *FecB* and *FecX^G* mutations were amplified from specific primers submitted to the action of *Ava II* and *Hinf I* endonucleases, respectively. Analysis of the fragments obtained in agarose gel revealed the existence of the *FecB* gene in 1.04% of “Santa Inês” breed females with a history of two or more offspring per birth and was not found in “Morada Nova” females. *FecX^G* mutation was not found in any of the animals studied. It was concluded that *FecB* mutations, although present in “Santa Inês” females, are of low frequency and therefore not a good tool for selecting prolific sheep. Moreover, the prolificity observed among the “Santa Inês” and “Morada Nova” breeds is not related to *FecB* or *FecX^G* mutations.

Key Words: Booroola, Galway, sheep, prolificity gene

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO DA LITERATURA	12
	2.1 Os fatores de crescimento e a proliferação.....	12
	2.2 Receptor da Proteína Morfogenética Óssea – 1B (BMPR 1-B).....	13
	2.3 O gene da Proteína Morfogenética Óssea– 15 (BMP-15).....	15
	2.4 Outras linhagens prolíficas relacionadas a genes da proliferação	17
	2.5 Aplicabilidade	19
	REFERÊNCIAS	20
	EXPERIMENTO I	27
	EXPERIMENTO II	45

1 INTRODUÇÃO

Os pequenos ruminantes ingressaram no Brasil com os colonizadores e, ao longo dos anos, sofreram um processo de seleção natural, adaptando-se às condições adversas do meio. Na atualidade, a ovinocultura constitui uma importante atividade sócio-econômica e, no nordeste brasileiro, há um rebanho diversificado, que vai desde a criação para subsistência do pequeno produtor, até às criações industriais com animais selecionados e altamente especializados. Destacam-se, entre as raças naturalizadas, a Cariri e a Barriga Negra, além de outras importadas, como a Santa Inês e Morada Nova, mas que também já se encontram adaptadas, fazendo parte do cenário da pecuária nordestina.

Até um passado recente, a ovinocultura constituía-se como atividade secundária para o setor pecuário. Contudo, nos últimos tempos, esta tem crescido como principal opção econômica para muitos produtores, em várias regiões brasileiras. Segundo os dados apresentados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística no censo agropecuário 1995/96 e 2006 (IBGE, 2006), o efetivo de ovinos em 2006 era de, aproximadamente, 16.019.170 cabeças, sendo que 9.379.380 (58,55%) encontravam-se na região Nordeste. Esses dados, confirmam a emergência desse setor como importante atividade econômica no Brasil.

Embora exista o reconhecimento do valor sócio-econômico da ovinocultura para o Nordeste brasileiro, a maior parte dos animais criados, nesta região, apresenta baixos índices de desempenho produtivo, com peso vivo de 8 kg aos 100 dias, peso médio da carcaça de 10 kg em machos com um ano, 80% de taxa de partos ao ano por matriz e prolificidade de 1-3 crias por parto (BNB, 1998).

Percebe-se que a crescente demanda da carne ovina, para o mercado interno e externo, está transformando a estrutura dos sistemas produtivos. Nesse aspecto, a grande competição comercial impulsiona a incessante busca de conhecimentos tecnológicos direcionados para o aumento da produtividade desses rebanhos. Tal exigência coloca os aspectos reprodutivos em lugar de destaque e a prolificidade passa a ser um dos fatores de grande importância nos programas de melhoramento e seleção de animais nessa cultura.

A existência de algumas linhagens de ovinos com alta prolificidade, as quais apresentam mutações em genes específicos, levanta o questionamento de que outras

raças prolíficas possam apresentar uma proximidade genética, até então desconhecida. Essa constatação poderá criar a possibilidade de identificação de linhagens brasileiras portadoras dessa característica, o que abre novos caminhos para pesquisas e a utilização efetiva deste conhecimento poderá colocar a ovinocultura brasileira, de forma competitiva, nesse emergente segmento da economia.

Este trabalho foi realizado com o objetivo de investigar a presença de mutações em genes relacionados à prolificidade em ovinos das raças Santa Inês e Morada Nova, especificamente os genes do receptor 1B da Proteína Morfogenética do Osso (BMPR-1B) e da BMP-15 e suas relações com o número de crias por parto em ovinos, bem como as possíveis aplicações em programas de seleção genética para essas raças citadas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Os fatores de crescimento e a ovulação

O número de folículos que ovulam, em mamíferos, é determinado por um complexo de sinais endócrinos, entre a hipófise e o ovário, e por meio de sinais parácrinos, dentro dos folículos ovarianos, entre o ovócito e suas células somáticas adjacentes.

Durante um ciclo estral, muitos folículos são recrutados e iniciam o crescimento, porém, não são todos que serão liberados para ovulação. Apenas um número de folículos, característico da espécie, chegará ao estágio pré-ovulatório, enquanto outros sofrerão atresia. Embora a seleção do folículo dominante não garanta a ovulação, supõe-se que ela seja definida em função do número de células da granulosa no folículo, com alto índice mitótico e capacidade de aromatizar andrógenos, já que folículos com poucas células da granulosa produzem menos esteróides, havendo baixa concentração de estradiol e alta de andrógeno no fluido folicular (ADASHI, 1996).

O folículo dominante é aquele que provavelmente ovulará, o que já é determinado uma semana antes do seu rompimento. O crescimento desses folículos até a fase pré-ovulatória se dá pela ação de vários fatores de crescimento que influenciam o desenvolvimento das células da granulosa (ADASHI, 1996). Estes fatores foram caracterizados como: fator transformador do crescimento α (TGF α , *transforming*

growth factor α) (LOBB e DORRINGTON, 1992), fator de crescimento tipo insulina I (IGF-I, *insulin-like growth factor* I), TGF β 1 e interleucina I (IL-I, *interleucin* I) (ADASHI, 1996).

Na família dos TGF- β , são conhecidos dois fatores que atuam no crescimento folicular, o fator de crescimento e diferenciação - 9 (GDF-9, *growth differentiation factor* - 9) e a proteína morfogenética do osso-15 (BMP-15, *bone morphogenetic protein*), ambos são produzidos pelo próprio ovócito e têm a célula da granulosa como alvo (FORTUNE, 2003).

Uma forma diferenciada de estudar os fatores que regulam o número de ovulações passou a ser utilizada nos experimentos realizados por McNatty et al. (2001), assim como nos de Wilson et al. (2001), que buscaram mutações, em genes maiores (Herança Monogênica) relativos à prolificidade, quais sejam: FecB relativo ao receptor BMP- 1B e FecX relativo ao fator BMP-15, que influenciam fenótipos alvo como a taxa de ovulação e o tamanho de ninhada. Assim, possibilitaram a aplicabilidade desses conhecimentos em testes moleculares padronizados. Neste contexto, os ovinos têm constituído, desde então, um excelente modelo para essa nova perspectiva na reprodução.

2.2 Receptor da Proteína Morfogenética Óssea – 1B (BMPR 1-B)

A Seleção por Marcadores Assistidos (MAS) e a introgressão genética são tecnologias aplicadas em programas para seleção de rebanhos. Os *loci* de características quantitativas (QTL), por exemplo, têm sido detectados em populações comerciais de rebanhos bovinos, suínos e ovinos, nestes últimos, em particular, foi descrito um QTL para a fecundidade (MONTGOMERY et al., 1993).

A base para esse estudo foi um programa de cruzamento realizado em 1952 pelos irmãos Sears, na localidade de Cooma, na Nova Gales do Sul, Austrália, os quais selecionaram um rebanho ovino prolífico, a partir de anotações sobre o tamanho da ninhada de ovelhas da raça Merino, gerando a linhagem Booroola com alta prolificidade. Essa característica foi estudada por pesquisadores do Instituto de Pesquisa CSIRO (Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization), que descreveram um dos primeiros exemplos de aplicação prática dos conhecimentos do mapeamento genético em ovinos, identificando a mutação Booroola no cromossoma 6

(MONTGOMERY et al., 2001). A partir desse ponto, foram possíveis estudos relativos à detecção dessas mutações, aplicados a trabalhos de seleção assistida, bem como aos reflexos dessa característica hereditária sobre os padrões fisiológicos ligados à fertilidade.

A continuidade de introgessão da prolificidade, em esquemas de cruzamentos empregando esta característica fenotípica, gerou o questionamento se o aumento do número de crias por parto, das linhagens de alta prolificidade, é resultante do acúmulo gradual, nos rebanhos, de ovelhas que carregam uma cópia do principal gene da prolificidade (DANKÒ, 2003).

Deve ser lembrado que o número de ovulações, em mamíferos, depende de um conjunto de fatores genéticos e ambientais, mas especialmente depende da linhagem familiar. A raça de ovino, Merino australiana/Booroola, como mencionado anteriormente, é uma das linhagens prolíficas caracterizada por excepcional fertilidade.

O gene Booroola (BMPR-1B - *FecB*) existe em um único locus autossômico do cromossomo 6q23-31, que é análogo ao cromossomo 4 humano, sendo o principal gene da prolificidade identificado em ovinos, resultante de uma mutação no receptor BMP-1B (WILSON et al., 2001).

A mutação do *FecB* foi encontrada no domínio altamente conservado do sinalizador intracelular serina treonina quinase do receptor BMP-1B, presente nos oócitos, em folículos primordiais e pré-antrais e nas células da granulosa dos folículos nos estágios primário e de crescimento, bem como no corpo lúteo. A troca de nucleotídeos, A por G, no gene, resulta na substituição do aminoácido Glutamina por Arginina (Q249R) na proteína (SOUZA et al., 2003, WILSON et al. 2001), exatamente no domínio intracelular quinase do receptor BMP-1B. Estudos destas mutações demonstraram que cada oócito tem um papel ativo em relação às células somáticas adjacentes, durante o desenvolvimento folicular, e assim exerce influência efetiva com relação ao número de folículos que alcançam a ovulação (MULSANT et al., 2001).

A mutação *FecB*, no gene BMPR-1B, é dominante sobre a taxa ovulatória com efeito aditivo, pois duas cópias de *FecB* aumentam o número de ovulações em cerca de 1,6 (PIPER et al. 1985). No entanto, um modelo multiplicativo foi mais adequado aos dados de Davis et al. (1999) em que cada cópia aumenta o número de ovulações em 90%. Animais com uma cópia da mutação têm entre três e quatro ovulações, enquanto aqueles com duas cópias têm algo em torno de cinco a 14 (McNATTY et al., 2001). Há

também a correlação entre a presença dessa mutação e uma reduzida taxa de atresia folicular (GONZÁLEZ-BULNES et al., 2004).

Os estudos da dinâmica folicular, em fêmeas que carregavam, ou não, o gene da prolificidade, demonstraram que o número de folículos em desenvolvimento nas fêmeas de idade mais avançada, de ambos os genótipos, era similar ao número encontrado em ovelhas mais jovens. Sugerindo que a maior taxa de ovulação em fêmeas com a mutação Booroola esteja relacionada a uma menor taxa de atresia (GONZÁLEZ-BULNES et al., 2004).

Quanto a aspectos hormonais, os estudos de Xia et al. (2003) apontam que a concentração de folistatina não é regulada pela mutação Booroola (*FecB*), contudo, ela parece afetar tanto a progesterona quanto o FSH, durante o ciclo estral e ao longo da prenhez, sugerindo que a BMP exerça um importante papel na regulação de ambos os hormônios. Campbell et al. (2003) evidenciaram, em experimentos *in vivo*, que esse gene atua nas gônadas femininas aumentando a sensibilidade aos estímulos gonadotróficos.

A mutação Booroola exerce ação principalmente no ovário, ao invés de alterar a secreção de gonadotrofina. Desse modo, os receptores da BMP parecem envolvidos com a regulação parácrina da ação do FSH. Se a mutação estiver causando uma redução nos receptores BMP-1B, isso pode resultar em uma inibição da diferenciação folicular, portanto, as pesquisas nessa área, deverão concentrar-se na elucidação das ligações naturais para BMP-1B em diferentes estágios de desenvolvimento folicular (SOUZA et al., 2003).

A mutação no BMPR-1B, encontrada em ovinos Booroola, é o segundo relato de alteração em um gene do grupo TGF- β , relacionado com a prolificidade em ovinos, após as descobertas de mutações em fatores de crescimento GDF9b/BMP15 (WILSON et al., 2001).

2.3 O gene da Proteína Morfogenética Óssea – 15 (BMP-15)

A proteína BMP-15 que também forma dímero com GDF9, sendo então conhecida também como GDF9B, consiste em um fator de crescimento que é membro da superfamília TGF β , o qual é expresso especificamente em oócitos (GALLOWAY et al., 2000). Essa proteína atua regulando a proliferação das células da granulosa e sua diferenciação, promovendo mitoses celulares, suprimindo a expressão do receptor para

o hormônio folículo estimulante (FSH), e estimulando os fatores ligados à expressão e assim exercendo um papel importante na fertilidade em mamíferos (OTSUKA et al., 2001). As proteínas desta superfamília (TGF β) são multifuncionais e regulam o crescimento e diferenciação de vários tipos de células, tomando papel crítico na fertilidade dos mamíferos, através dos fatores de crescimento como o GDF9, localizado nos oócitos, e BMP com receptores expressos nos ovários (WILSON et al., 2001).

A linhagem Inverdale, prolífica, foi gerada a partir de uma família de ovinos da raça Romney, descendente de uma ovelha com histórico de 33 crias em 11 partos (DAVIS et al., 1991). Posteriormente, estudos de segregação em filhos e netos dos portadores desse gene demonstraram que o locus foi carregado no cromossoma X, denominado de locus da fecundidade Inverdale (*FecX^I*). Nestas ovelhas, a prolificidade é resultante de uma mutação no gene da BMP-15 (DAVIS et al., 1991 e 1995).

Nas ovelhas Inverdale e Hanna, foram identificados pontos separados de mutação no gene BMP-15, correspondendo a sítios na região de codificação do peptídeo maduro do fator de crescimento (GALLOWAY et al., 2000; BODENSTEINER et al., 2000).

A mutação *FecX^I* (V31N) é caracterizada pela transição de T-A que resulta na substituição do aminoácido valina (V) por asparagina (N) no resíduo 31 da proteína madura. Esta alteração não altera a estrutura da proteína, mas interfere na formação de dímeros (GALLOWAY et al., 2000).

A linhagem Hanna foi encontrada também em ovinos Romney, não relacionados com a linhagem Inverdale, mas que exibiram o mesmo fenótipo de alta prolificidade, ligada ao cromossomo X. A mutação encontrada nestas ovelhas denominou-se *FecX^H* e difere da Inverdale (*FecX^I*), pois nelas, a troca de nucleotídeos C-T resulta na substituição de uma glutamina por um ponto de parada, no resíduo 23 da proteína madura (Q23Ter), o que implica na formação de uma proteína mais curta e, provavelmente, biologicamente inativa (GALLOWAY et al. 2000).

A expressão do gene BMP-15 foi localizada exclusivamente nos oócitos do estágio primário do desenvolvimento folicular. Davis et al. (1992) citaram que há um completo bloqueio do desenvolvimento folicular normal em fêmeas que portam duas cópias da mutação Inverdale (II), duas da mutação Hanna (HH), ou uma cópia de cada mutação (HI). Índices aumentados de ovulação são encontrados em fêmeas com somente uma cópia de cada mutação (I+ ou H+) (DAVIS et al., 1992). Este aumento no

índice de ovulação dos animais heterozigotos pode ser explicada com base na função da BMP-15. O homozigoto mantém seus ovários atrofiados, com folículos que não passam do estágio primordial, pela ausência da ação da proteína no crescimento e diferenciação folicular. Os heterozigotos, que têm a proteína em menor quantidade, possuem maior expressão dos receptores para FSH nas células da granulosa, resultando em maior número de folículos em desenvolvimento, produzindo estrógeno e com maior expressão dos receptores de LH, o que proporciona maior número de ovulações (OTSUKA et al., 2001).

Essas descobertas, sobre o gene BMP-15, tornaram possível o uso de testes de DNA para determinar se as outras linhagens de ovelhas prolíficas carregariam mutações sem a necessidade de informações referentes ao pedigree (MONTGOMERY et al., 1993; GALLOWAY et al., 1999; DAVIS et al., 2002).

2.4 Outras linhagens prolíficas relacionadas a genes da prolificidade

Desde os primeiros estudos relativos aos modelos de herança para número de ovulação e tamanho de ninhada, em rebanhos prolíficos, tem sido mostrado que os principais genes para a prolificidade são segregados em ovelhas Merino-Booroola, nas quais foi identificado o gene *FecB* (DAVIS et al., 1982; PIPER e BINDON, 1982), enquanto que na linhagem Romney, também prolífica, foi encontrado o gene Inverdale (*FecX^I*) (DAVIS et al., 1991) e posteriormente Hanna (*FecX^H*) (GALLOWAY et al., 2000).

Nas raças já estudadas, em nível molecular, embora, os fenótipos sejam semelhantes, foram definidas mutações no gene BMP-15 diferentes das linhagens Inverdale e Hanna. Essas linhagens incluem ovelhas Cambridge (*FecX^C*) (HANRAHAN; OWEN, 1985), Thoka (*Fec^I*) (JONMUNDSON; ADALSTEINSSON, 1985), Javanês (*FecX^J*) (BRADFORD et al., 1986), Olkaska (BMPR-1B) (RADOMSKA et al., 1988), Belclare (*FecX^B*) (HANRAHAN, 1991), Lacune (*FecX^L*) (BODIN et al., 1998), assim como Woodlands (*FecX²*) (DAVIS et al., 2001).

Por sua vez, estudos subsequentes demonstraram que a mutação no gene BMPR-1B estava presente nas ovelhas chinesas Merino e Hu-Yang, inferindo que, nessas raças,

esse gene também é o principal fator que controla a fecundação, podendo ser empregado como marcador genético para prolificidade (ZHONG-FAGANG et al., 2004).

A mutação $FecX^G$ (Galway), encontrada nas raças Cambridge, é caracterizada pela troca de nucleotídeos C por T introduzindo um códon de parada no lugar de uma glutamina no resíduo 239 da proteína madura (Q239Ter) (HANRAHAN et al., 2004).

Posteriormente foram identificados genes maiores em ovelhas asiáticas, Han (BMPR-1B e BMP-15) (YAN-YADONG et al., 2005 e CHU et al., 2007) e Hu da cauda curta (BMPR-1B) (YAN-YADONG et al., 2005).

Ainda com relação aos estudos em genes maiores, no Brasil, Castro et al. (2006) caracterizaram um novo SNP (polimorfismo de um só nucleotídeo) localizado no gene GDF-9, na raça Santa Inês e consideraram que o polimorfismo deste SNP 1034 pode estar relacionado à alta frequência de ovulação, característica dessa raça.

O gene Booroola continua sendo investigado em várias raças de ovinos. Davis et al. (2006) encontraram essa mutação em ovelhas indianas da raça Garole e citaram a possibilidade da interação filogenética entre essas e a Booroola-Merino, a qual, por sua vez é sua descendente. No mesmo ano, Chu et al. (2007) citaram a ocorrência simultânea dos genótipos Booroola ($FecB$) e Inverdale ($FecX^I$) em ovelhas Han do rabo curto, correlacionando esses achados ao fenótipo tamanho de ninhada.

Na mesma linha, Kumar et al. (2008) investigaram simultaneamente os genes Booroola ($FecB$) e Galway ($FecX^G$), em ovelhas indianas da raça Kendrapada, com histórico de prolificidade, citando a ocorrência do gene Booroola para essa raça, contudo, mencionam uma não fixação desse gene. Nesse estudo não foram encontradas mutações relativas ao gene Galway ($FecX^G$).

Há outras raças resultantes de diversos cruzamentos, e também as nativas, que apresentam alta prolificidade e, no entanto, não se conhece a sua característica genética. Também é desconhecido o distanciamento genético que estes animais apresentam daqueles altamente prolíficos, que sabidamente possuem genes mutantes $FecX$ ou $FecB$, e a relação desses fatores com a dinâmica folicular. Esse, portanto, é um dos pontos em aberto para a realização de mais pesquisas nessa área, o que se percebe pelo crescente número de estudos relacionados à investigação da relação de genes maiores em diversas raças de ovinos com histórico de prolificidade, em diferentes países.

2.5 Aplicabilidade

Desde que as mutações *FecB* e *FecX* foram identificadas nos genes BMP-1B e BMP-15, respectivamente, estes passaram a ser chamados de genes maiores, que afetam a prolificidade. Um “gene maior” é considerado aquele em que a diferença entre homozigotos seja de no mínimo 0,5 no desvio padrão. No caso da ovulação, são genes que, em cópia única, elevam o número médio de ovulações em mais de 0,2 (Davis, 2005).

Os genes mutantes da prolificidade, *FecB* e *FecX*, poderão ser usados, junto aos dados de fenótipo e pedigree, para oferecer melhores estimativas no valor do cruzamento de ovinos. Na teoria, os genes mapeados, podem ser empregados como marcadores genéticos do DNA, mas essa perspectiva ainda não é praticada em ovelhas. Os maiores benefícios de se incorporar esses genes identificados nos programas de cruzamento são para as características mais difíceis de melhorar, especialmente, quando uma alta fração de variação genética é explicada pelos genes já conhecidos. Daí a importância dos testes de DNA combinados às técnicas reprodutivas, no sentido de reduzir o intervalo entre gerações e, conseqüentemente, aumentar o ganho genético animal (GODDARD, 2002).

Tecnologias, tais como as de marcadores genéticos, identificação de parentesco e introgressão genética podem ser aplicadas em programas de seleção de criações. Mapas genéticos estão disponíveis para bovinos, suínos e ovinos, proporcionando uma base genética para o desenvolvimento de programas de seleção assistida (DAVIS e DeNISE, 1998).

Nimbkar et al. (2002), na Índia, citaram a realização de um programa de melhoramento genético em ovinos, da raça Deccani, fazendo uso de testes para o gene *FecB*, demonstrando a possibilidade da aplicação prática desse conhecimento, em programas de seleção para incrementar a prolificidade em rebanhos nativos.

Outro estudo aplicado foi o de Arnyasi et al. (2004), no qual avaliaram um programa de cruzamento húngaro empregando ovelhas Booroola-Merino e raças nativas. Os autores constataram que houve introgressão do alelo *FecB* e que este estava relacionado a um aumento na taxa de ovulação dos animais resultantes dos cruzamentos.

Na China, foi realizado um programa de melhoramento para ovelhas Han e Hu da cauda curta, baseado em estudos de identificação de receptores da BMP-1B, a qual determina a fecundidade em ovelhas Booroola Merino. Foi demonstrada a

aplicabilidade da seleção por marcadores assistidos (MAS) com relação à prolificidade, quando constatada a correlação da identificação da BMP-1B à característica de maior número de crias por parto destas ovelhas (YAN-YADONG et al., 2005).

Ovelhas Garole, portadoras da mutação do gene Booroola (*FecB*) foram cruzadas com ovelhas Malpura não prolíficas, resultando em aumento no tamanho da ninhada dos descendentes desse cruzamento (KUMAR et al., 2006).

Desde 2003, no Brasil, há um programa de introgressão assistida para a mutação do Gene Booroola. Segundo Betemps e Pimenta (2008), esta é uma das mais novas tecnologias desenvolvidas pela Embrapa Pecuária Sul – Unidade de pesquisa da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA, vinculada ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, MAPA – e tem como objetivo gerar animais mais produtivos, além de garantir a formação de uma progênie com estas características, em especial para as raças ovinas comerciais Corriedale e Texel.

Percebe-se que, apesar de ainda haver a necessidade de mais estudos quanto à elucidação da relação de genes maiores, tais como *FecB*, *FecX* ou GDF- 9, e os seus efeitos benéficos na caracterização gênica para a prolificidade, a sua determinação, por si, já encontra possibilidade de aplicação, pois representa, de fato, uma ferramenta para marcação genética de fêmeas mais prolíficas.

REFERÊNCIAS

ADASHI, E.Y. The ovarian follicle: life cycle of a pelvic clock. In: ADASHI, E.Y., ROCK, J.A., ROSENWAKS, Z. **Reproduction endocrinology, surgery and technology**. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996, v.1, p. 212-234.

ARNYASI, M. et al. Case study of a Hungarian breeding programme using imported Booroola rams. **Archiv für Tierzucht**, Dummerstorf, v. 27, n. 4, p. 359-366, 2004.

BARROSO, D. D. Vinho para engordar ovinos. **O Berro**, Uberaba, v. 71, p.12-13, 2004.

BETEMPS, C.; PIMENTA, M. **Gene Booroola no Ciência para a vida** (26/07/2008). < <http://www.embrapa.br/imprensa/noticias/2008/setembro/4a-semana/gene-booroola-no-ciencia-para-vida/>>. Acesso em: 30 de janeiro de 2009.

BANCO DO NORDESTE DO BRASIL. Relatório Social Banco do Nordeste do Brasil. In: WORKSOHP SOBRE CAPRINOS E OVINOS TROPICAIS. 1998, Fortaleza. **Proceedings...** Fortaleza: BNB, 1998, p. 20-23.

BODIN, L. et al. Hyper-prolificacy in the French Lacaune sheep breed. **Proceedings of the World Congress on Genetic Applied to Livestock Production**, Armidale, v.27, n.1, p.11-14, 1998.

BODENSTEINER, K.J. et al. Expression of growth and differentiation factor-9 in the ovaries of fetal sheep homozygous or heterozygous for the Inverdale prolificacy gene (*FecX¹*). **Biology of Reproduction**, Champaign, v.62, n.6 p.1479-85, 2000.

BRADFORD, G.E. et al. Reproduction in Javanese sheep - evidence for a gene with large effect on ovulation rate and litter size. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.63, n.2, p.418-431, 1986.

CAMPBELL, B. K. et al. The *FecB* (Booroola) gene acts at the ovary: in vivo evidence. **Reproduction**, Cambridge, v.126, n.1, p.101-11, 2003.

CASTRO, E. A. et al. Characterization of a new SNP in the Growth and Differentiation Factor 9 (GDF-9) gene, specific for the brasilian Santa Inês sheep. In: WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION, 8. 2006, Belo Horizonte, Brasil. **Anais...** Belo Horizonte: [s.n.], 2006 p.13-18.

IBGE. **Censo Agropecuário 2006: Resultados Preliminares**. Rio de Janeiro, 2007. Disponível em: <[HTTP://www.sidra.ibge.gov.br](http://www.sidra.ibge.gov.br)>. Acesso em: 23fev. 2009.

CHU, M. X. et al. Mutations in BMPR-1B and BMP-15 genes are associated with litter size in Small Tailed Han Sheep (*Ovis aires*). **Journal of Animal Science**, Champaign, v.85, n.3. p.598-603, 2007.

DAVIS, G.H. et al. Infertility due to bilateral ovarian hypoplasia in sheep homozygous (*FecX^I*) for the inverdale prolificacy gene located on the X-chromosome. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 46, n.4, p.636-40, 1992.

DAVIS, G.H. et al. Segregation of a major gene influencing fecundity in progeny of Booroola sheep. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, Wellington, v.25, n.4, p.525-529, 1982.

DAVIS, G.H. et al. Evidence for the presence of a major gene influencing ovulation rate on the X-chromosome of sheep. **Biology of Reproduction**, Champaign, v.44, n.4, p.620-624, 1991.

DAVIS, G.H. et al. Discovery of the Inverdale gene (*FecX*). **Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production**. Mosgiel, v. 55, p. 289–290, 1995.

DAVIS, G. H.; DeNISE, S. K. The impact of genetic markers on selection. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 76, p. 2331-2339, 1998.

DAVIS, G.H. et al. Combined effect of the Inverdale and Booroola prolificacy genes on ovulation rate in sheep. **Proceedings of the Association for the Advancement of Animal Breeding and Genetics**. Mandurah, v.13, p.74-77, 1999.

DAVIS, G.H. et al. Evidence that an imprinted gene on the X chromosome increases ovulation rate in sheep. **Biology of Reproduction**, Champaign, v.64, p.216-221, 2001.

DAVIS, G.H. et al. DNA tests in prolific sheep from eight countries provide new evidence on origin of the Booroola (*FecB*) mutation. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 66, p.1869-74, 2002.

DAVIS, G. H. et al. Investigation of the Booroola (*FecB*) and Inverdale (*FecX^I*) mutations in 21 prolific breeds and strains of sheep sampled in 13 countries. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 92 , n. 1 - 2 , p. 87 – 96, 2006.

DANKÒ, G. N. Some practical and biotechnological methods for improving reproduction traits in sheep. **Comunicado Técnico on line**, v.11, p. 1-6, Abr. 2003. Disponível em: <http://www.date.hu/actaagraria/2003> Acesso em: 09 mar. 2007.

FORTUNE, J.E. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of pre-antral follicles. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 78, n.3-4 p. 135-163, 2003.

GALLOWAY, S. M. et al. A genetic test to identify carries of the ovine Inverdale fecundity gene. **Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production**, Mosgiel, v. 59, p. 114-116, 1999.

GALLOWAY, S. M.; McNATTY, K. P.; CAMBRIDGE, L. M.; et al. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. **Nature Genetics**, New York, v.25, n.3, p.279-283, 2000.

GODDARD, M. E. Breeding wool sheep for the 21st century. **Wool Tecnology and Sheep Breeding**, Christchurch, v. 50, n. 3, p. 349-58, 2002.

GONZÁLEZ-BULNES, A. et al. Effect of ageing on hormone secretion and follicular dynamics in sheep with and without the Booroola gene. **Endocrinology**, Bethesda, v.145, n.6, p.2858-64, 2004.

HANRAHAN, J. P. Evidence for single gene effects on ovulation rate in the Cambridge and Belclare breeds. In: INTERNATIONAL WORKSHOP, 2., 1991, Paris, **Anais...** Les Colloques:INRA, 1991. p.93-102.

HANRAHAN, J.P.; OWEN, J. B. Variation and repeatability of ovulation rate in Cambridge ewes. **Animal Production**, Bletchley, v.40,p.529, 1985.

HANRAHAN, J. P. et al. Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors GDF9 and GDF15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in

Cambridge and Belclare sheep (*Ovis Aires*). **Biology of Reproduction**, Champaign, v.70, n.4, p.900-909, 2004.

JONMUNDSON, J. V.; ADALSTEINSSON, S. Single genes for fecundity in Ice-landic sheep. In: Land, R. B.; ROBINSON, D. W. (Ed.), **Genetics of reproduction in sheep**. London: Butterworths, 1985. p.159-168.

KUMAR, S. et al. Identification of the *FecB* mutation in Garole × Malpura sheep and its effect on litter size, **Small Ruminant Research**, London, v.64, n.3, p. 305-310, 2006.

KUMAR, S. et al. Screening for Booroola (*FecB*) and Galway (*FecX^G*) mutations in Indian sheep, **Small Ruminant Research**, London, v. 80, n. 1-3, p. 57-61, 2008.

LOBB, D. K.; DORRINGTON, J. Intraovarian regulation of follicular development. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 28; p. 343-354, 1992.

McNATTY, K.P. et al. Genetic mutations influencing ovulation rate in sheep. **Reproduction, Fertility and Development**, Melbourne, v. 13, n.7-8, p. 549-55, 2001.

MONTGOMERY, G.W. et al. The ovine Booroola fecundity gene (*FecB*) is linked to markers from a region of human chromosome 4q. **Nature Genetics**, New York, v.4, n.4, p.410-414, 1993.

MONTGOMERY, G.W. et al. Genes controlling ovulation rate in sheep. **Reproduction**, Cambridge, v. 6, n. 121, p. 843-852, 2001.

MULSANT, P. et al. Mutation in bone morphogenetic protein receptor-IB is associated with increased ovulation rate in Booroola Mérino ewes. In: **Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America**, Washington, US, v. 98, n.9, p. 5104-5109, 2001.

NIMBKAR, C. et al. Breeding program for the genetic improvement os Deccani sheep of Maharashtra, In: WOLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION, 7., 2002, Montpellier, **Proceedings...** Montpellier: [s.n.], 2002. p.1- 4.

OTSUKA, F. S. et al. Bone morphogenetic protein-15 inhibits follicle-stimulating hormone (FSH) action by suppressing FSH receptor expression. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda. v.276, n.14, p.11387-11392, 2001.

PIPER, L. R. et al. The single gene inheritance of the high litter size of the Booroola Merino. In: LAND, R.B.; ROBINSON, D.W. (Ed.), **Genetics of Reproduction in Sheep**. London: Butterworths. 1985. p.115-125.

PIPER, L.R.; BINDON, B. M. The Booroola Merino and the performance of médium non-Peppin crosses at Armindale. In PIPER, L. R.; BINDON, B. M.; NETHERY, R.D. (Ed.), **The Booroola Merino**. Melbourne: CSIRO. 1982. p.9-19.

RADOMSKA, M.J. et al. Inheritance of high prolificacy of the Olkuska sheep (preliminary results). **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 60, p. 597-598, 1988.

SOUZA, C. J. H. et al. Bone morfogenetic proteins and folliculogenesis: lessons from the Booroola mutation. Reproduction in domestic ruminants. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON REPRODUCTION IN DOMESTIC RUMINANTS , 6., 2003, Crieff Scotland. **Proceedings...** Crieff Scotland: [s.n.], 2003. p. 361-370.

YAN-YADONG; CHU-MINGXING; ZENG-YONGQING; et al. Study on bone morphogenetic protein receptor IB as a candidate gene for prolificacy in Small Tail Han sheep ando Hu sheep. **Journal of Agricultural Biotechnology**, Beijing, v. 13 n. 1, p. 66-71, 2005.

WILSON, T. et al. Highly prolific Booroola sheep have a mutation in the intracellular Kinase domain of bone morphogenetic protein IB receptor (ALK-6) that is expressed in both oocytes and granulose cells. **Biology of Reproduction**. Champaign, v. 64, n.4 p.1225-35, 2001.

XIA, Y. et al. Concentrations of progesterone, follistatin, and follicle-stimulating hormone in peripheral plasma across the estrous cycle and pregnancy in merino ewes

that are homozygous or noncarriers of the Booroola gene. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 69, n. 3, p. 1079-84, 2003.

ZHONG-FAGANG; WANG-XINHUA; LIU-SHOUREN et al. Studies of BMPR-IB and BMP15 as candidate genes for fecundity in Merino and Hu-Yang sheep from China. **Animal Biotechnology Bulletin**, Haidian, v.9, n. 1, p. 139-45, 2004.

EXPERIMENTO I

**LEVANTAMENTO DE MUTAÇÃO BOORoola (FecB) EM
OVINOS DAS RAÇAS SANTA INÊS E MORADA NOVA DO
SEMI-ÁRIDO NORDESTINO BRASILEIRO**

LEVANTAMENTO DO GENE BMPR – 1B EM OVINOS DAS RAÇAS SANTA INÊS E MORADA NOVA DO SEMI-ÁRIDO NORDESTINO BRASILEIRO

Glenda Mônica Luna de HOLANDA^{1*}; Manoel ADRIAO²; Diogo Manoel Farias da SILVA³; Clarissa Neuman Ramos CÉSAR³; Vânia Lúcia de Assis Santana⁴; Daniela Maria Bastos de SOUZA², Aurea WISCHRAL⁵

RESUMO

Esse estudo objetivou investigar a presença de mutações Booroola (*FecB*) relativas à prolificidade em ovinos das raças Santa Inês e Morada Nova, criadas no Semi-árido nordestino Brasileiro. Para tanto, foram colhidas 293 amostras de sangue de fêmeas com histórico de múltiplas crias por parto e outras 563 sem histórico de partos gemelares, além de 23 reprodutores da raça Santa Inês. Através da técnica PCR-RFLP foram identificados apenas seis animais (1,04%) com genótipos mutantes, para o gene Booroola, no grupo de fêmeas com histórico de prolificidade da raça Santa Inês e nenhuma da raça Morada Nova. Todas as fêmeas com a mutação *FecB* eram heterozigotas (B+) apresentando fragmentos de 190 e 160pb. Apesar de o gene *FecB* ter sido identificado neste estudo para ovinos Santa Inês, sua ocorrência não pode ser considerada expressiva se sua frequência for levada em conta. É provável que a forte seleção ocorrida ao longo dos anos para conformação das características da raça (em especial exploração extensiva para corte) não favoreceu a fixação do gene Booroola. Percebe-se também que a baixa ocorrência de animais portadores da mutação Booroola encontrados, pode desestimular a sua utilização, como ferramenta comercial de marcação para melhoramento genético em nível de prolificidade na raça Santa Inês e Morada Nova. Como esse polimorfismo foi detectado em algumas raças de origem indiana e mongol, que não figuram entre aquelas descritas como originárias da raça aqui estudada, sugere-se estudos filogenéticos de maior amplitude, no intuito de se verificar a origem desse gene, inclusive com as raças da qual os ovinos Santa Inês derivaram.

Termos para indexação: Booroola, gene da prolificidade, ovino, PCR-RFLP.

¹ Instituto Agrônomo de Pernambuco - IPA- glendaholanda@ipa.br *autor para correspondência.

² Laboratório de Fisiologia Animal Molecular Aplicada (FAMA) - Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (DMFA) - Universidade Federal Rural de Pernambuco.- UFRPE

³ Bolsista PIBIC - FAMA - DMFA - UFRPE

⁴ Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - LANAGRO - PE

⁵ Departamento de Medicina Veterinária - UFRPE - aurea@dmv.ufrpe.br

OCCURRENCE OF BMPR-1B GENE IN SHEEP OF THE ‘SANTA INÊS’ AND ‘MORADA NOVA’ BREEDS IN THE SEMI-ARID REGION OF NORTHEAST BRAZIL

ABSTRACT

This study was carried out with the aim of investigating Booroola mutations (*FecB*) related to the prolificity of “Santa Inês” and “Morada Nova” breeds of sheep in the semi-arid region of northeastern Brazil. A total of 293 blood samples were collected from ewes with a history of multiple offspring per delivery and another 563 samples were collected from females without a history of multiple births. Twenty-three “Santa Inês” rams were also studied. The PCR-RFLP technique only identified six animals (1.04%) with mutant genotypes for the Booroola gene among the group of “Santa Inês” females with a history of prolificity. No mutations were found in “Morada Nova” ewes. All ewes with the *FecB* mutation were heterozygous (B+) and had 190 and 160 pb fragments. Although the *FecB* gene was identified in this study in “Santa Inês” sheep, its occurrence cannot be considered expressive if frequency is taken into account. It is possible that the intense selection that has taken place over the years to consolidate the characteristics of the breed (especially extensive exploitation for meat) did not favor fixation of the Booroola gene. The small proportion of animals found with the Booroola mutation may also discourage the use this gene as a commercial tool for genetic improvement in terms of prolificity among the “Santa Inês” and “Morada Nova” breeds. As this polymorphism has been detected in some sheep of Indian and Mongolian origin (neither which originated the breeds studied here), more in-depth phylogenetic studies should be carried out in order to determine the source of this gene, including analyses of the breeds from which “Santa Inês” sheep derived.

Indexing terms: Booroola, prolificity gene, sheep, PCR-RFLP.

INTRODUÇÃO

Até um passado recente, a ovinocultura constituía-se como atividade secundária para o setor pecuário. Contudo, nos últimos tempos, essa tem crescido como principal opção econômica para muitos produtores, em várias regiões brasileiras. Segundo os dados apresentados por Lima (2008), o efetivo de ovinos em 2006 era de, aproximadamente, 16.019.170 de cabeças, sendo que 9.379.380 (58,55%) encontravam-se na região Nordeste. Esses dados confirmam a emergência desse setor como importante atividade econômica no Brasil.

Com relação à formação dos rebanhos ovinos comerciais de corte, de acordo com Simplício (2008), a raça Santa Inês, em especial, tem despontado, principalmente, devido a sua adaptabilidade em todas as regiões brasileiras. Nesse contexto, atualmente, estima-se que essa raça, naturalizada no Nordeste brasileiro, represente 25 a 30% do rebanho nacional.

Sousa (2008) considera que a raça Santa Inês é bem difundida para corte e será a base para 80% da produção de carne ovina no país. A formação dessa raça envolve a contribuição de outras três, quais sejam: Bergamácia, Morada Nova e Somalis, das quais a Morada Nova sendo considerada como uma das mais prolíficas. Contudo, há poucos criadores dessa raça no Brasil e grandes riscos de descaracterização e desaparecimento da mesma. Percebendo esses riscos, foi criada uma rede de instituições que estudará e atuará na preservação dos ovinos da raça Morada Nova. A formação do grupo de trabalho dirigido para essa finalidade envolvendo instituições públicas como o INSA, UFRPE, IPA, EMBRAPA, UFERSA, EMATER-CE, assim como a Associação de Criadores da Raça Morada Nova, foi o principal resultado do I Workshop do Projeto Caracterização e Bases para o Melhoramento Genético de Ovinos da Raça Morada Nova, realizado em Fortaleza, no dia 6 de novembro de 2008, como divulgado no Informativo do Centro Nacional de Pesquisa de Caprinos e Ovinos (2008) da EMBRAPA. Justifica-se assim, a importância de trabalhos efetuados nas raças aqui estudadas.

Nesse sentido, segundo Simplício (2008), um dos pontos críticos, e fundamentais, numa exploração ovina para corte é a prolificidade, sobrevivência de crias e a precocidade. Corroborando com essa linha de pensamento, o criador precisa ficar atento aos critérios de seleção para a característica de prolificidade porque, ao

selecionar apenas características como os maiores animais e mais pesados, eles deixam de fora aqueles cujos pais são prolíficos. Contudo, deve ser considerado que o que se busca no sistema de produção de carne é a eficiência produtiva de ovelha, a qual é mais bem representada por quilograma de cordeiro desmamado por ovelha parida. Assim, a característica prolificidade necessita ser melhor trabalhada na raça Santa Inês e deve ser ressaltada em qualquer programa de seleção (SOUSA, 2008).

Contudo, a seleção assistida para prolificidade era apenas realizada através de dados de pedigree. Mas, após os trabalhos de Wilson et al. (2001), onde foram identificadas as mutações relativas à prolificidade, em ovelhas Booroola-Merino, através do estabelecimento de técnicas reprodutivas como a Reação em Cadeia da Polimerase – Polimorfismos de Comprimento dos Fragmentos de Restrição (PCR-RFLP), tornou-se possível a investigação desses genes em outras raças sem a necessidade de longos estudos de observação fenotípica. Nessa ocasião, foi demonstrado que a alta prolificidade das ovelhas Booroola é causada por uma alteração que ocorreu naturalmente no gene do receptor para proteínas morfogenéticas de osso tipo 1 B (BMPR 1-B), o que possibilitou o desenvolvimento de testes genéticos capazes de identificar esta variação no DNA dos animais. Desse modo, foram abertos novos caminhos para trabalhos de seleção genética, relativos à prolificidade, sem a necessidade de investigação de pedigree. Assim, a seleção através da identificação de marcadores, poderia incluir, de forma mais prática, cada animal escolhido em programas de seleção para prolificidade.

Nesse contexto, a existência de algumas linhagens de ovinos com alta prolificidade, as quais apresentam mutações em genes específicos, levanta o questionamento de que outras raças prolíficas possam apresentar uma proximidade genética, até então desconhecida. Essa constatação abre a possibilidade de identificação de linhagens brasileiras portadoras dessa característica, o que leva a novos caminhos para pesquisas e utilização efetiva deste conhecimento, o qual poderá colocar a ovinocultura brasileira, de forma competitiva, nesse emergente segmento da economia brasileira (HOLANDA et al., 2006).

Considerando a importância da ovinocultura para a pecuária brasileira e a necessidade de pesquisas em alguns aspectos produtivos dessa espécie, são necessários estudos sobre o Gene da Prolificidade nessas raças, as suas correlações com o processo de ovulação e possíveis aplicações em programas de seleção genética.

Portanto, dada à relevância das raças Santa Inês e Morada Nova, como importantes componentes para rebanhos de corte comerciais brasileiros, e a carência em estudos sobre prolificidade em ovinos no Brasil, objetivou-se realizar um levantamento da existência de mutações no gene BMPR-1B, através de técnicas moleculares, como ferramenta de seleção para a característica de prolificidade nessas raças.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido com a aprovação do Comitê de Ética do DMV da UFRPE, sob protocolo N° 23082.04287/2006.

I- Locais de colheita das amostras

Na busca de animais prolíficos, foram visitadas propriedades, do semi-árido nordestino brasileiro, nos estados da Paraíba (Mogeyro), Pernambuco (Brejo da Madre de Deus, Vicência, Pesqueira, Serra Talhada e Triunfo) e Ceará (Sobral).

II- Animais

Para esse trabalho, foram empregados 879 ovinos, selecionados ao acaso e caracterizados, quanto à prolificidade, mediante histórico reprodutivo em arquivos das propriedades visitadas. Desse modo, além de 23 machos da raça Santa Inês, foram utilizados apenas fêmeas que apresentaram, no mínimo, três registros de parição, dividindo-os em dois grupos de animais: uma cria/parto (n= 393 Santa Inês e 170 Morada Nova) e duas ou mais crias/parto (n=181 Santa Inês e 112 Morada Nova).

III- Local de processamento das amostras

O trabalho de investigação das mutações com as técnicas PCR e PCR-RFLP foi realizado no Laboratório de Fisiologia Animal Molecular Aplicada (FAMA), do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (DMFA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

IV- Colheita e processamento das amostras de sangue

Foram colhidas amostras de sangue (5ml) da veia jugular de cada animal, utilizando o sistema *vacutainer*, com anticoagulante (Citrato de Sódio). As amostras foram, imediatamente, acondicionadas em recipiente contendo gelo, até o momento do processamento no laboratório.

Para a obtenção dos leucócitos, o sangue foi submetido à centrifugação (825g por 10 min) e, assim, o plasma foi desprezado com o auxílio de uma pipeta. Nos tubos em que se encontravam as hemácias e leucócitos, foi adicionado solução salina (0,9 % em NaCl), homogeneizados e, em seguida, centrifugados, por cinco minutos, a 825g e descartou-se o sobrenadante. Esta operação foi repetida por três vezes ou até que a série branca ficasse em suspensão, e pudesse ser removida para ser armazenada a -20°C.

a) Extração de DNA de leucócitos

A extração do DNA leucocitário foi realizada, através do método fenol-clorofórmio modificado (MANIATIS et al., 1989). A reação constou de 100 µL da amostra de leucócito, 100 µL de TE (Tris 10 mM – EDTA 1 mM pH 8,0) e 100 µL de fenol equilibrado pH 8,0. A amostra foi agitada por 1 minuto e, em seguida, centrifugada a 14.000 rpm por 5 min a 4°C. Ao sobrenadante foram adicionados 100 µL de fenol-clorofórmio (1:1) e a mistura foi agitada por 1 min e centrifugada a 18.000 g por 5 min. Novamente, ao sobrenadante foram adicionados 100 µL de clorofórmio, misturados por 1 min e centrifugados a 18.000 g por 5 min. Em outro tubo foram adicionados, pela ordem: 10 µL de acetato de amônio 3 M, 100 µL do sobrenadante do tubo anterior (onde se encontrava o DNA) e 100 µL de isopropanol. Após misturar por 1 min e incubar por no mínimo 60 min no congelador, o tubo foi centrifugado a 18.000 g por 15 min, desprezado o sobrenadante e lavado o sedimento com 500 µL de etanol 70% na centrífuga a uma rotação de 18.000 g durante 5 min a 4°C. O etanol a 70% foi retirado e o sedimento foi posto para secar a temperatura ambiente. Após secagem foi diluído em 50 µL de água ultra-pura.

O DNA extraído foi analisado em gel de agarose a 0,8%, corado com Brometo de Etídio, visualizado em luz ultravioleta e fotografado para verificação de sua qualidade. A quantificação do DNA foi realizada em espectrofotômetro (Bionate 3-ThermoScientific).

b) Amostras-controle

Como controles-positivo, para validação da técnica, foram empregadas amostras de DNA do Booroola Merino, Importados da Nova Zelândia, pela Embrapa Pecuária Sul/Bagé – RS, na década de 70, e gentilmente cedidas pelo Pesquisador Dr. Carlos José Hoff de Souza. Por sua vez, todas as corridas em gel de agarose foram também monitoradas por controle negativo, empregando-se todos os componentes da reação, exceto amostras de DNA.

c) Reações em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para as reações foram utilizados 2,5 µL de tampão (10X PCR, 1,75 µL de 50 mM de MgCl₂), 0,5 µL do primer sense e 0,5 µL do anti-sense (10pM), 2mM de dNTP, 1 UI Taq DNA polimerase, DNA (100ng/µL) e água ultra-pura para o volume final de 25µL. Os oligonucleotídeos utilizados, os quais amplificam bandas com 190 pares de base (bp), tiveram as seguintes sequências segundo Davis et al. (2002):

Primer sense 5'-CCAGAGGAACAATAGCAAAGCAAA-3'

Primer anti-sense 5'-CAAGATGTTTTTCATGCCTCATCAACACGGTC-3'

A PCR foi realizada em termociclador com os seguintes ciclos (DAVIS et al, 2002, modificado): Uma desnaturação inicial a 94°C por 2 min, 8 ciclos de desnaturação a 94°C por 15 seg, anelamento a 62°C por 30 seg e extensão a 72 °C por 30 seg. Seguidos por 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 15 seg, anelamento a 60°C por 30 seg e extensão a 72°C por 15 seg., mantendo numa temperatura final de 8°C.

O DNA amplificado foi então analisado em gel de agarose (2%), com marcador de peso molecular DNA-Ladder 50 bp, corado com Brometo de Etídio, visualizado em luz ultravioleta e fotografado para constatar sua amplificação conforme descrito por Wilson et al. (2001).

d) Reação em Cadeia da Polimerase – Polimorfismo do Comprimento dos Fragmentos de Restrição (PCR-RFLP)

Para visualização da mutação *FecB*, no DNA ovino, foi empregada a metodologia que detecta a mutação em um dos oligonucleotídeos, na qual o produto da

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) possui um ponto de restrição, forçado, para a enzima *Ava II* (G | GACC) quando o animal é portador da mutação, conforme descrito por Davis et al. (2002), com modificações.

A reação de corte do DNA com a enzima de restrição *Ava II* foi realizada para um volume final de 15 µL. Para cada reação, foi preparada uma mistura contendo 8.5 µL de água ultra-pura, 1,5 µL de tampão da enzima e 0,8U da enzima *Ava II* e 5 µl do DNA amplificado (produto de PCR). Esse preparado ficou por 4 horas a 37°C, em condições de tamponamento. Após este tempo, foi realizada a inativação da enzima à 65°C por 20 minutos. O DNA digerido foi observado em gel de agarose a 3%, com marcador de peso molecular DNA-Ladder 50 bp, corado com Brometo de Etídio, visualizado em luz ultravioleta e fotografado, para verificação dos fragmentos.

Desse modo, os produtos com a mutação Booroola homozigotos (BB) apresentariam em fragmentos de 160pb, enquanto aqueles negativos para o gene Booroola (++), continuariam com 190pb. As amostras heterozigotas (B+) deveriam apresentar fragmentos com 190pb e com 160pb.

V) Análise estatística.

Os dados referentes às bandas encontradas foram analisados, com relação à sua frequência e correlacionados com o fenótipo, através do Teste do Sinal (presença e ausência), utilizando a fórmula Teste T para infinito grau de liberdade, admitindo distribuição normal padrão (CAMPOS, 1983).

RESULTADOS

Foi detectada a presença de dois genótipos para a raça Santa Inês, *FecB*⁺⁺ (ausência de mutação) e *FecB*^{+B} (mutação em heterozigose) (Fig 1.). Não foram identificados animais homozigotos para a mutação *FecB* (*FecB*^{BB}). O estado de mutação Booroola em heterozigose foi constatado em apenas 6 dos 597 animais da raça Santa Inês estudados (1,04%). Para esses 6 animais, a média do número de crias por parto foi igual a 2,49 (Tab. 1). É importante notificar que em todas as fêmeas com essa mutação, foi registrado pelo menos um parto com três crias.

Na raça Morada Nova não foi identificado nenhum animal com a mutação Booroola (*FecB*) entre as 282 fêmeas avaliadas, cujo tamanho médio da ninhada foi de 1,35 crias/parto.

Tabela 1 – Número médio do tamanho da ninhada conforme o genótipo encontrado, para o gene *FecB*, em ovelhas das raças Santa Inês e Morada Nova

Raça	Genótipo	<i>FecB</i> ^{B+}	<i>FecB</i> ⁺⁺	Total
Santa Inês	No. de amostras (%)	6 (1,04)	568 (98,96)	574
	Tamanho médio da ninhada	2,49a	1,24b	1,25
Morada Nova	No. de amostras (%)	0	282 (100)	282
	Tamanho médio da ninhada	0	1,35	1,35

a e b, $P < 0,01$ – *FecB*^{B+}: heterozigoto; *FecB*⁺⁺: homozigoto selvagem

Por sua vez, a média de crias por parto, em toda a população Santa Inês estudada, com genótipo *FecB*⁺⁺, foi de 1,24 (Tab. 1) diferindo significativamente ($P < 0,01$) do grupo em heterozigose (2,49). É importante salientar que não foram constatadas mutações relativas ao gene Booroola para o grupo de animais com histórico de apenas uma cria por parto, assim como não foram diagnosticadas mutações nos machos estudados.

Das 574 amostras de fêmeas ovinas da raça Santa Inês, 181 eram animais com histórico de partos de múltiplas crias e 393 constaram de fêmeas com histórico de uma única cria por parto. Dentre aquelas, com partos de múltiplas crias, apenas seis fêmeas tiveram a confirmação da mutação para o gene Booroola, caracterizando geneticamente a prolificidade através da técnica PCR-RFLP conforme Figs. 1 e 2, nas quais estão dispostos os resultados de animais com mutação Booroola em heterozigose para o gene *FecB* na raça Santa Inês.

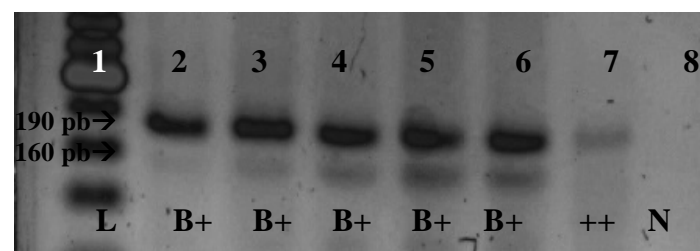


Figura 1 - Fragmentos obtidos pela técnica PCR-RFLP para o gene Booroola em fêmeas prolíficas da raça Santa Inês. 1 – marcador molecular – 50pb. Linhas 2 a 5, animais em heterozigose (B+) para a mutação estudada por corte com enzima *Ava* II. 6 - controle positivo - animal heterozigoto Booroola-Merino. 7 - animal sem mutação (selvagem) com 190pb (++). 8 - controle negativo (sem DNA).

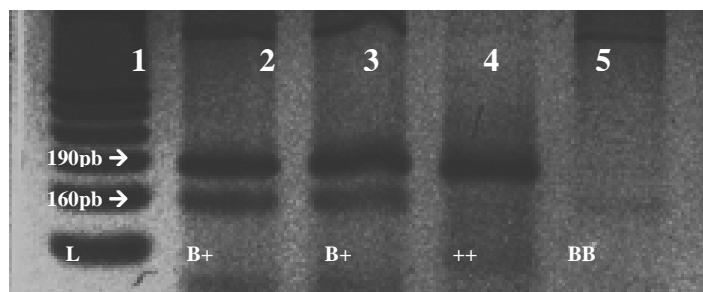


Figura 2 – Resultados de PCR-RFLP. Amostras após digestão com enzima *Ava* II em animais da raça Santa Inês. 1- Marcador 50pb. 2- Animal heterozigoto (B+). 4 - animal sem mutação (++). 3 e 5 –controle positivo - animais Booroola-Merino para os genótipos heterozigoto (B+ / 190 e 160pb) e homozigoto (BB / 160pb), respectivamente.

DISCUSSÃO

O gene Booroola consiste em uma mutação autossômica identificada em estudos de segregação da característica fenotípica do tamanho de ninhada (PIPER; BINDON, 1985), ou da taxa ovulatória (DAVIS et al., 1982). Esse fenótipo possui caráter de herança mendeliana de segregação, a qual é causada por um gene maior, com efeitos aditivos para a taxa ovulatória e parcialmente dominante para o tamanho de ninhada. Os seus alelos foram denominados *FecB* para o alelo descrito altamente prolífico e *Fec+* para a banda selvagem. Esse gene foi denominado *FecB* pelo Comitê em nomenclatura genética de ovinos e caprinos (COGNOSAG, 1989).

Através de informações zootécnicas escrituradas das propriedades visitadas, constatou-se o tamanho médio de ninhada para a raça Santa Inês igual a 1,25 (Tab. 1) e para a Morada Nova 1,35 crias/parto, considerando-se todas as fêmeas utilizadas nesse estudo. Este índice está de acordo com o observado por Mexia et al. (2004), que encontraram a média para a raça Santa Inês de 1,24 crias por parto, em ovelhas suplementadas, criadas na região Sul do país.

Nesse estudo, reproduzindo-se a técnica PCR-RFLP citada por Wilson et al. (2001) com modificações, e com a utilização dos *primers* descritos por Davis et al. (2002), foi estabelecida a técnica para os estudos de prolificidade, utilizando a mutação Booroola, encontrando-se uma incidência de 1,04% de animais da raça Santa Inês portadores desta característica (Tab. 1). Todos os animais portadores foram observados em heterozigose (Fig. 1 e 2), fato este que ainda não havia sido relatado para uma raça brasileira.

Comparando-se o tamanho de ninhada entre os grupos com genótipos heterozigotos para a mutação (2,49) e indivíduos não mutantes (1,24), observou-se que a presença de uma cópia para o gene Booroola ($FecB^B/FecB^+$ - indivíduos heterozigotos) tem efeito significativo sobre o tamanho da ninhada, aumentando em 1,15% o número de crias por parto nas ovelhas Santa Inês portadoras dessa mutação (Tab. 1).

Nesse sentido, segundo Piper et al. (1985) o efeito do gene *FecB* é aditivo para o tamanho de ninhada e taxa de ovulação, aumentando a presença de corpos lúteos em 1,65 por cópia e tamanho de ninhada em 0,9 para uma cópia desse gene e mais 0,4 para duas cópias. Segundo Davis et al. (1982) cada cópia aumenta a taxa ovulatória em 90%

e os estudos de Guan et al. (2007) confirmam os achados de Piper et al. (1985). O aumento de 1,15 para o tamanho da ninhada, neste experimento, aproxima-se mais do sugerido de incremento para a taxa ovulatória do que para o tamanho de ninhada aqui encontrado. Ressalta-se também que não houve nenhuma fêmea estudada na qual houvesse registro de mais de 3 crias por parto. Talvez essa condição possa ter levado ao menor número de reabsorções embrionárias e encontrando-se um índice mais próximo ao relatado para o número de ovulações.

A frequência de animais heterozigotos, para a mutação Booroola, encontrada, nesse experimento, é um fato, apesar de baixa, devido ao grande número de amostras examinadas. Resultados de pesquisas, até agora realizados no mundo, constataram a presença dessa mutação em poucas raças. Segundo Wilson et al. (2001) todas derivariam da Booroola-Merino, e nos estudos de Davis et al. (2002), não havia, até então, evidência de que outra raça, exceto ovinos Merino, Garole ou Javanese em que o *FecB* fosse identificado, fazendo-se referência a ligações filogenéticas dessas raças, apontando ligações entre as raças Merino e Garole. Contudo, mencionou o desconhecimento se as ovelhas Javanese do rabo curto (Thin Tail), adquiriram o gene Booroola diretamente das ovelhas Garole ou via Merino da Austrália.

Posteriormente, Davis et al. (2006) encontraram o gene *FecB* em ovelhas de origem mongol, Han e Hu, as quais não apresentavam ligações com as raças até então portadoras dessa mutação.

Guan et al. (2007), na Ásia, estudaram a frequência de polimorfismos para a prolificidade em algumas raças, assim como os seus efeitos para o tamanho de ninhada, peso e tamanho corporal. Esses autores encontraram uma alta frequência de prolificidade para as ovelhas Hu (100% homozigotas) e para a linhagem de corte Merino Chinesa observaram os três genótipos (BB; B+ e ++), o que está de acordo com os experimentos de Davis et al. (2006), os quais também encontraram apenas homozigotos para as ovelhas Hu. O fenômeno de se encontrar os três genótipos para as ovelhas Merino-chinesas, deve-se provavelmente a todo o processo de estabelecimento da raça que resultou em uma fixação do padrão genético, homozigoto, para as ovelhas Hu (GUAN et al., 2007) assim como para a população de ovelhas Garole (DAVIS et al., 2002).

Ainda, Davis et al. (2002) observaram dois padrões de genótipos relativos ao gene Booroola para dois grupos de ovelhas Garole, de linhagens puras, originárias da Índia. Os mesmos relataram a identificação de ovelhas homo e heterozigotas para a

presença desse gene, em um dos grupos e a não fixação dos mesmos genes para o outro grupo, os quais apresentavam um fenótipo de apenas uma cria por parto.

Nesse estudo, considera-se que a raça Santa Inês, embora tenha apresentado exemplares heterozigotos para a mutação estudada, tenha sofrido uma pressão de seleção objetivando a conformação para corte que, ao longo dos anos, não considerou a característica prolificidade. Ressalta-se também que, no Brasil, com os sistemas de criação em sua grande maioria extensivos ou semiextensivos, as fêmeas com histórico de partos gemelares são muitas vezes indesejadas, pelos pecuaristas, por conta dos problemas de manejo que poderiam gerar nesses sistemas de criação.

A ausência de *FecB* em ovelhas prolíficas tais como: Thoka, Woodlands, Olkuska, Lacune, Belclare e Cambridge, indicam que outras mutações, em genes autossômicos, as quais têm influência sobre a taxa ovulatória, possam estar presentes nessas ovelhas (DAVIS et al., 2002). A ausência desta mutação e a prolificidade observada na raça Morada Nova também pode ser explicada desta forma, indicando a necessidade de estudos sobre outros fatores responsáveis pelas taxas ovulatórias nesta raça. Apesar da característica prolificidade não ser bem aceita para o sistema de criação extensivo, 40% das ovelhas da raça Morada Nova, que participaram deste estudo, tinham histórico de ao menos um parto com múltiplas crias.

Assim, com a baixa frequência encontrada para o gene Booroola na raça Santa Inês, constatou-se que a utilização de levantamentos sobre mutações relativas ao gene Booroola nesta raça, como marcador, não constitui uma ferramenta adequada para uso comercial em programas de melhoramento para essa característica.

Com relação a estudos em genes maiores, no Brasil, Castro et al. (2006) caracterizaram um novo SNP (polimorfismos de um só nucleotídeo) localizado no gene GDF-9, na raça Santa Inês e consideraram que o polimorfismo do SNP 1034 observado pode estar relacionado à alta frequência de ovulação, característica dessa raça. Como são poucos os estudos direcionados à investigação de genes maiores relacionados à prolificidade nos rebanhos ovinos brasileiros, percebe-se a necessidade da continuidade desses estudos para a raça citada bem como em suas raças formadoras.

Deve ser considerado que existem pesquisas sobre filogenia, em ovinos, baseadas em investigação de polimorfismos, comuns entre raças ou linhagens. Entre eles o gene Booroola, já descrito, tem sido escolhido para realização desses estudos de mapas de ligação.

Segundo Crawford et al. (1994), os mapas de ligação constituem uma importante ferramenta para identificação de genes associados a características de produção em animais de grande porte (*Production traits*). Os programas de seleção em animais domésticos, baseados em mensuração fenotípica, têm melhorado. Contudo, as alterações genéticas que delineiam a maior parte das alterações são desconhecidas. Um entendimento da estrutura e função dos genomas dos animais domésticos providos por mapas genéticos oferecem a oportunidade de serem mapeadas variações genéticas responsáveis pelas diferenças de desempenho. Os marcadores moleculares, ligados a características herdáveis, irão possibilitar uma seleção mais rápida de animais elite e eventualmente permitir a identificação desses genes que influenciam a expressão genética.

Dias-Tascón et al. (2001) citam que durante os últimos anos, se tem alcançado um importante avanço na elaboração dos mapas genéticos das espécies domésticas. Em particular, os mapas de ligação, obtidos mediante estudos de segregação familiar, têm experimentado um importante impulso com o aparecimento dos marcadores do tipo microssatélite. A principal característica desses marcadores é seu elevado polimorfismo, sendo utilizados como *loci* “chave” de referência na integração dos mapas físicos e de ligação. Quanto ao mapa de ligação ovino, o cromossoma objeto de maior atenção tem sido o N° 6, devido a que nele foi localizada a mutação *FecB*, responsável pelo fenótipo Booroola, assim como os genes da caseína. Esse cromossoma representa 4,31% do genoma ovino (MATEJKA; CRIBIU, 1987) e apresenta homologia com os cromossomas N° 6 bovino, 4 humano, 3 e 5 murino e o 8 suíno (LORD et al., 1996).

Assim, como foi encontrado *FecB+* em ovinos da raça Santa Inês, sugere-se pesquisas para identificar um possível elo de ligação desses ovinos brasileiros com o Booroola-Merino, Garole, Javanese, Han, e Hu. Também devem ser investigados outros genes, particulares à raça Santa Inês bem como em suas raças formadoras, os quais possam explicar a herança dessa característica para os seus descendentes, além do gene Booroola.

CONCLUSÕES

A baixa frequência do gene Booroola (*FecBM^{PR}-1B*), na população Santa Inês estudada (1,04), indica que, apesar de herança aditiva, as seleções realizadas ao longo

dos anos, especialmente para carne e conformação racial, entre outras, podem ter suprimido essa característica dessa população levando à quase eliminação do mesmo nessa raça. Os programas de seleção para conformação racial e carne devem ser revistos quanto a critérios que possam levar à exclusão de exemplares com potencial para partos múltiplos.

Considerando a metodologia aqui empregada, a investigação da mutação relativa ao gene Booroola nas raças Santa Inês e Morada Nova, como marcador, não constitui uma ferramenta adequada para uso comercial em programas de melhoramento para essa característica.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi conduzido com o suporte financeiro da FACEPE e Bolsa CAPES / FACEPE. Agradecemos aos produtores rurais, Arcôncio Lins Neto, Érica Ximenes, Jânio José de Brito Cavalcanti Júnior, Romero Queiroz e José Otávio, bem como à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Caprinos e Ovinos/Sobral - CE e ao Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) / Serra Talhada - PE, que cederam seus animais para obtenção do material desta pesquisa. Também agradecemos ao Dr. Carlos José Hoff de Souza – Embrapa Pecuária Sudeste – Por ter cedido amostras para os controles-positivo deste experimento.

REFERÊNCIAS

CAMPOS, H. **Estatística experimental não paramétrica**, 4.ed., Piracicaba: ESALQ. 1983. 349p.

CASTRO, E. A. et al. Characterization of a new SNP in the Growth and Differentiation Factor 9 (GDF-9) gene, specific for the brasilian Santa Inês sheep. In: WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION, 8., 2006, Belo Horizonte, Brasil. **Anais...** Belo Horizonte: [s.n.], 2006 p.13-18.

COGNOSAG - Committee on Genetic Nomenclature of Sheep and Goats Banco de dados, http://www.angis.org.au/Databases/BIRX/mis/mis_form.html, 1989, ACESSO em 12 nov 2008.

CRAWFORD, A. M. et al. Sheep Linkage Mapping Nineteen Linkage Groups Derived From the Analyses of Paternal Half-Sib Families, **Genetics**, Bethesda, v.137, p. 573-579, 1994.

DAVIS, G.H. et al. Segregation of a major gene influencing fecundity in progeny of Booroola sheep **New Zealand Journal of Agricultural Research**, Wellington, v.25, p.525-529, 1982.

DAVIS, G.H. et al. DNA tests in prolific sheep from eight countries provide new evidence on origin of the Booroola (*FecB*) mutation. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 66, p.1869-74, 2002.

DAVIS, G. et al. Investigation of the Booroola (*FecB*) and Inverdale (*FecX¹*) mutations in 21 prolific breeds and strains of sheep sampled in 13 countries. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 92 , n. 1 - 2 , p. 87 – 96, 2006.

DIAS-TASCÓN, C. et al. Estudio de las relaciones de ligamiento entre microsatélites del cromossoma 6 em el ganado ovino de raza churra. URL<[HTTP://acteon.webs.upv.es/CONGRESOS/Aida2001/does/diez-t.pdf](http://acteon.webs.upv.es/CONGRESOS/Aida2001/does/diez-t.pdf)> Acessado em dezembro de 2008.

GUAN, F.; LIU, S.; SHI, G. et al. Polymorphism of *FecB* gene in nine sheep breeds or strains and its effects on litter size, lamb growth and development. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 99, p.44-52, 2007.

INFORMATIVO DO CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE CAPRINOS E OVINOS
ANO 2 nº 24 OUT/NOV 2008 ACESSO EM FEVEREIRO DE 2009 P.9 EMBRAPA Sobral

LIMA, R.A.S. **A concentração geográfica da produção de ovinos: comparativo dos resultados dos censos 1995/96 e 2006.** In: SOBER, XLVI CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL, Acre, 2008, p. 1-10. Disponível em: <http://www.sober.org.br/palestra/9/767.pdf> Acessado em 12 nov 2008.

LORD, E.A. et al The linkage map of sheep Chromosome 6 compared with orthologous regions in other species **Mammalian Genome**, New York, v.7, n.5, p. 373-376, 1996.

HOLANDA, G. M. L.; ADRIÃO, M.; WISCHRAL, A. O Gene da Prolificidade em Ovinos. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, Recife, v.9, n. 2/3, p.45-53. 2006.

MANIATIS, T.; FRITSCH, E.F; SAMBROOK, J. (Ed.) **Molecular cloning a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, v.3, P.1-3, 1989.

MATEJKA, M.; CRIBIU, E. P. Idiogram and standardized G-band karyotype of the domestic sheep (*Ovis aries* L.) **Génetics, Selection and Evolution**, Versailles, v.19, n.1, p.113-126. 1987.

MEXIA, A. A. et al. Desempenho reprodutivo e produtivo de ovelhas Santa Inês suplementadas em diferentes fases da gestação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 33, n. 3, p.658 - 667, 2004.

PIPER, L. R. et al. The single gene inheritance of the high litter size of the Booroola Merino. In: LAND, R.B., ROBINSON, D.W. (eds), **Genetics of Reproduction in Sheep**. London: Butterworths, 1985. p.115-125.

PIPER L.R.; BINDON, B. M. The Booroola Merino and the performance of medium non-Peppin crosses at Armidale. In: PIPER, L.R.; BINDON, B.M.; NETHERY, R. D. (Eds) **The Booroola Merino**, Melbourne: Ed. CSIRO. 1985. pp 9–20.

SIMPLÍCIO, A. A. Oportunidades do Santa Inês, **O Berro**, Uberaba, Disponível em <<http://www.revistaberro.com.br/?materiais/ler,968>> Acesso 24 nov 2008.

SOUSA, W. **Genética do Santa Inês cada vez mais passa por melhorias na PB**. Disponível em: <http://www.paraiba.pb.gov.br/index.php?option=com_content&task=view&id=27647&Itemid=2> Acessado em 12 de nov de 2008.

WILSON, T. et al. Highly prolific Booroola sheep have a mutation in the intracellular Kinase domain of bone morphogenetic protein IB receptor (ALK-6) that is expressed in both oocytes and granulosa cells. **Biology of Reproduction**. Champaign, v. 64, n.4 p.1225-35, 2001.

EXPERIMENTO II

**LEVANTAMENTO DE POLIMORFISMOS DO GENE BMP – 15
(*FecX^G*) EM OVINOS DAS RAÇAS SANTA INÊS E MORADA
NOVA DO SEMI-ARIDO NORDESTINO BRASILEIRO**

LEVANTAMENTO DE POLIMORFISMOS DO GENE BMP - 15 (*FecX^G*) EM OVINOS DAS RAÇAS SANTA INÊS E MORADA NOVA DO SEMI-ARIDO NORDESTINO BRASILEIRO

Glenda Mônica Luna de HOLANDA^{6*}, Diogo Manoel de Farias da Silva⁷, Suzana Santino Nunes da Rocha², Arthur Nascimento de Melo⁸, Edvaldo Rosas dos Santos Junior³, Manoel ADRIÃO⁹, Aurea WISCHRAL¹⁰

RESUMO

Foram investigados polimorfismos no gene BMPR-1B relativos à mutação Galway (*FecX^G* / BMP15), através da técnica PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism), em ovinos das raças Santa Inês e em uma de suas raças formadoras, a Morada Nova, na região semiárida do nordeste brasileiro; todos os ovinos estudados tinham histórico de partos com múltiplas crias. Foram colhidas 181 amostras de sangue de animais da raça Santa Inês e 112 amostras da raça Morada Nova. O DNA foi extraído com a técnica de fenol-clorofórmio e a região do gene BMP15 foi amplificada por PCR, com *primers* específicos e submetido à endonuclease *Hinf* I. Este experimento não identificou mutações *FecX^G* nas raças estudadas e, desse modo, é possível que outros fatores relativos à prolificidade estejam presentes. Sugerem-se estudos com outros marcadores que sejam específicos dessas raças para explicar a prolificidade das mesmas e tornar possível o desenvolvimento de técnicas de seleção baseadas em marcadores assistidos (MAS), bem como o estudo dos mecanismos de prolificidade inerentes a elas.

Termos para indexação: Galway, ovino, gene da prolificidade, Santa Inês, Morada Nova.

⁶ Instituto Agrônomo de Pernambuco - IPA- glendaholanda@ipa.br *autor para correspondência

⁷ Graduandos Iniciação Científica- PIBIC/CNPq - UFRPE

⁸ Doutorandos – Programa de Pós-graduação em Ciência veterinária - UFRPE

⁹ Professor Adjunto- Laboratório de Fisiologia Animal Molecular Aplicada - Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – Universidade Federal Rural de Pernambuco.- UFRPE

¹⁰ Professora Associada - Departamento de Medicina Veterinária Veterinária – UFRPE – aurea@dmv,ufrpe.br

INVESTIGATION OF BMP-15 (*FecX^G*) GENE POLYMORPHISM IN 'SANTA INÊS' AND 'MORADA NOVA' SHEEP IN THE SEMI-ARID REGION OF NORTHEAS BRAZIL

ABSTRACT

Polymorphism linked to the BMP15 gene (Galway *FecX^G*) was investigated using the PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorfism) technique on sheep of the 'Santa Inês' breed and one of the breeds that gave origin to this breed – 'Morada Nova' – in the semi-arid region of northeastern Brazil. All sheep studied had a history of births with multiple offspring. One-hundred eighty-one blood samples were collected from animals of the "Santa Inês" breed and 112 samples were collected from the 'Morada Nova' breed. DNA was extracted using the phenol-chloroform technique. A fragment of the BMP-15 gene was amplified using PCR with specific primers and submitted to *Hinf* I endonuclease. This experiment identified no *FecX^G* mutations in the breeds studied. Therefore, other factors may be related to the observed prolificity. Studies with other markers specific to these breeds are needed in order to explain their prolificity and allow the development of selection techniques based on assisted markers (MAS) as well as the study of the prolificity mechanisms inherent to these races.

Indexing terms: Galway, sheep, prolificity gene, Santa Inês, Morada Nova.

INTRODUÇÃO

A ovinocultura, no Brasil, tem estado presente desde o seu descobrimento, quando ingressaram os primeiros exemplares de pequenos ruminantes domésticos no país. Desde então, a criação de ovinos tem tido o caráter extensivo, permanecendo concentrada, em sua maior parte, entre o Sul e Nordeste brasileiros. Apenas na última década, houve um novo quadro com a exploração comercial desses animais em ritmo de cadeia produtiva, percebendo-se, então, a ramificação dessa criação por todo o país e, em especial, o incremento comercial tecnificado dessa produção na região Sudeste.

Com relação à raça Santa Inês, a qual teve a sua formação, naturalmente, ao longo dos anos, através de cruzamentos da base crioula nacional com ovinos das raças Bergamácia, Morada Nova e Somalis, essa exerce grande influência na formação dos rebanhos ovinos comerciais de corte no Brasil. De acordo com Simplício (2008), a raça Santa Inês tem despontado, principalmente, devido a sua adaptabilidade em todas as regiões brasileiras. Nesse contexto, estima o mesmo autor que represente, na atualidade, entre 25 a 30% do rebanho nacional.

Entre as raças formadoras da Santa Inês, a Morada Nova, por sua vez, é citada como uma das mais prolíficas, possuindo, no entanto, um rebanho pouco expressivo, sendo sua presença dada a poucos criadores persistentes.

Embora exista o reconhecimento do valor sócio-econômico, dessas duas raças, para a ovinocultura brasileira, a maior parte dos animais criados, especialmente no Nordeste, ainda apresenta baixos índices de desempenho reprodutivo e produtivo (BNB, 1998). Já em 2004, sem mudanças nesse quadro, Barroso cita que essa baixa produtividade se deva, entre outros fatores, mas em especial, aos poucos recursos tecnológicos para ovinos nessa região.

Sobre esse aspecto, o que precisa ser melhorado na raça Santa Inês é o número de cordeiros nascidos por ovelha parida. O criador tem que ficar atento aos critérios de seleção quanto à característica de prolificidade, porque, ao selecionar os maiores animais e mais pesados, ficam excluídos aqueles cujos pais são de parto duplo Sousa (2008).

Percebendo-se a importância do aumento da eficiência produtiva em rebanhos relacionados a ganhos com a prolificidade, vários são os estudos nessa direção. Assim, na década de 80, Piper e Bindon (1982) apontaram, pela primeira vez, a prolificidade

em ovelhas Merino-Booroola, sendo devido a um gene de efeito maior. Em seguida, outros estudos elucidativos permitiram o conhecimento mais profundo do mecanismo de atuação desse gene. Com a possibilidade da realização de testes dirigidos à identificação das mutações pontuais, relativas ao primeiro gene estudado, e a descoberta de outras mutações relacionadas à prolificidade em outras raças e linhagens, foi dado um impulso no sentido da sua utilização em programas de melhoramento genético, visando um aumento de prolificidade em rebanhos.

Com relação aos genes maiores, os mecanismos de herança do BMP15 foram desvendados ainda na década de 90 em ovelhas, desde os trabalhos de Davis et al. (1991) que já apontavam uma herança ligada ao cromossomo X para essa característica, criando a oportunidade de estudos quanto à fisiologia ovariana e fertilidade em outros mamíferos (DAVIS et al., 1999; OTSUKA et al., 2001).

Desse modo, a mutação *FecX^G* (Q239Ter) no gene BMP-15 foi associada com um aumento na taxa de ovulação, mas também à esterilidade em ovelhas Cambridge e Belclare (HANRAHAN et al., 2004), dependendo de estar em hetero ou homozigose, respectivamente. Segundo Davis (2004), na Nova Zelândia, o uso comercial dos marcadores para essa característica, consiste em reter filhas prolíficas do cruzamento de carneiros portadores dessa mutação com ovelhas não portadoras.

Existem outros loci tais quais *FecX^I*, *FecX^H*, *FecX^B* and *FecX^G*, que são mutantes diferentes do gene BMP15 (Proteína morfogenética do osso 15) o qual é essencial para a fertilidade em ovelhas (GALLOWAY et al., 2000; DAVIS et al., 2001; HANRAHAN et al., 2004; DAVIS et al., 2006).

A existência de algumas linhagens de ovinos com alta prolificidade, as quais apresentam mutações em genes específicos, levanta o questionamento de que outras raças prolíficas, inclusive as raças nativas, possam apresentar uma proximidade genética, até então desconhecida. Essa constatação poderá criar a possibilidade de identificação de linhagens brasileiras portadoras dessa característica, o que abre novos caminhos para pesquisas e a utilização efetiva deste conhecimento poderá colocar a ovinocultura brasileira, de forma competitiva, nesse emergente segmento da economia.

Como a mutação *FecX^G* foi encontrada em raças não relacionadas (Belclare/Cambridge e Small Tailed Han) (Davis et al., 2006), é interessante estudar a existência de *FecX^G* nessas raças Santa Inês e Morada Nova com a utilização desses Marcadores.

Assim, o objetivo desse estudo foi o de detectar polimorfismo de um único nucleotídeo do gene Galloway (*FecX^G*) em ovelhas, das raças Santa Inês e Morada Nova, de expressiva importância no contexto da produção nacional.

MATERIAL E MÉTODOS

I- Local de processamento das amostras

O trabalho de investigação das mutações com as técnicas PCR e PCR-RFLP foram realizados no Laboratório de Fisiologia Animal Molecular Aplicada - FAMA, do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (DMFA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

II- Animais

Na busca de animais prolíficos, que possuíam escrituração zootécnica, foram visitadas 27 propriedades nos estados da Paraíba (Mogéiro), Pernambuco (Brejo da Madre de Deus, Vicência, Pesqueira, Serra Talhada e Triunfo) e Ceará (Sobral).

Foram colhidas amostras de 293 ovelhas, sendo 181 da raça Santa Inês e 112 ovelhas da raça Morada Nova, selecionadas entre rebanhos, com escrituração zootécnica, da região do semi-árido nordestino.

As ovelhas foram caracterizadas quanto a sua prolificidade, mediante histórico reprodutivo em arquivos das propriedades visitadas. Foram utilizados apenas animais que apresentaram, no mínimo, três registros de parição, com pelo menos dois partos com múltiplas crias.

III- Coleta e processamento das Amostras

Foram colhidas amostras de sangue (5ml) de cada animal, utilizando o sistema vacutainer, com anticoagulante Citrato de Sódio. As amostras foram, imediatamente, acondicionadas em recipiente contendo gelo, até o momento do processamento no laboratório.

a) Processamento das amostras de sangue

Para a obtenção dos leucócitos, o sangue foi submetido à centrifugação (825g por 10 min) e, em seguida, o plasma foi desprezado com o auxílio de uma pipeta. Nos tubos onde se encontravam as hemácias e leucócitos, foi adicionado solução salina (0,9% em NaCl), foram homogeneizados, em seguida, centrifugados, por cinco minutos, a 825g e descartou-se o sobrenadante. Esta operação foi repetida por três vezes ou até as células (eritrócitos e leucócitos) ficarem bem lavadas. Em seguida, a camada das células leucocitárias foi coletada e armazenada à -20°C .

b) Extração de DNA de leucócitos

O DNA genômico foi extraído através do método fenol-clorofórmio segundo os critérios de Maniatis et al. (1989) com modificações. Posteriormente esse DNA (*pellet*) foi ressuspenso com água ultra-pura e estocada a -20°C .

O DNA extraído foi analisado em gel de poliacrilamida a 1%, corado com Brometo de Etídio, visualizado em luz ultravioleta e fotografado para verificação de sua qualidade. A quantificação do DNA foi realizada em espectrofotômetro (Bionate 3-ThermoScientific).

c) Reações de amplificação em cadeia da Polimerase (PCR)

Para visualizar a mutação no rebanho ovino, foi empregada a metodologia que amplifica a região do gene que possui um ponto de mutação, no qual o produto da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) conteve um ponto de restrição, forçado, para a enzima *Hinf* I baseada nas citações de Hanrahan et al. (2004) com modificações.

A PCR foi realizada para um volume final de 25 μL /amostra, com 2,5 μL de tampão 10X PCR, 1,75 μL de 50 mM de MgCl_2 , 1 μL do primer sense e 1 μL do primer anti-sense, 2,5 μL de dNTPs, 15 μL de água ultra-pura, 0,8 U Taq DNA polimerase, 30 ng de DNA e água ultrapura para ajustar o volume final.

Os oligonucleotídeos utilizados, para detectar a mutação do gene BMP-15 com a enzima *Hinf* I, os quais amplificam bandas com 141pb, foram desenhados conforme Hanrahan et al. (2004):

Primer sense 5' CACTGTCTTCTTGTTACTGTATTTCAATGAGAC 3'

Primer anti-sense 5' GATGCAATACTGCCTGCTTG 3'.

As condições de amplificação para os *primers* do gene BMP – 15 foram: desnaturação a 95 °C por 5 min; seguido por 30 ciclos de desnaturação a 95 °C por 45s, anelamento a 63 °C por 45 s, e extensão a 72 °C por 1 min, com uma temperatura de extensão final de 72 °C por 10 min em um termociclador (Eppendorf A.G).

O DNA amplificado foi analisado em gel de poliacrilamida a 1%, com marcador de peso molecular DNA-Ladder 10 bp, e fotografado para constatar sua amplificação.

d) Reação em Cadeia da Polimerase – Polimorfismo do Comprimento dos Fragmentos de Restrição (PCR-RFLP)

A reação de corte do DNA com a enzima de restrição *Hinf* I foi realizada para um volume final de 15 µL. Em cada reação, foi preparada uma mistura contendo 8,5 µL de água ultra-pura, 1,5 µL de tampão da enzima e 10 U da enzima *Hinf* I. Em seguida, homogeneizou-se, a mistura, em vórtex. Na sequência, foram transferidos 10 µL da mistura para um tubo contendo 5 µL do DNA amplificado (produto de PCR). Esse preparado ficou por 4 horas a 37 °C, em condições de tamponamento. Após este tempo, foi realizada a inativação da enzima à 65 °C por 20 minutos. O DNA digerido foi observado em gel de poliacrilamida a 8%, com marcador de peso molecular DNA-Ladder 50 bp, corado com Brometo de Etídio, visualizado em luz ultravioleta e fotografado, para verificação dos alelos.

Os *primers* foram desenhados para detectar o $FecX^G$, tendo-se como referência aqueles descritos por Hanrahan et al. (2004), Segundo Kumar et al. (2008), o produto da PCR de indivíduos sem a mutação (Tipo selvagem) possui um ponto de restrição para a enzima *Hinf* I (G/ACT), enquanto os portadores da mutação não possuem esse ponto de restrição. Após a digestão, os indivíduos do tipo selvagem ($FecX^{++}$) apresentarão fragmentos de 111pb e 30pb, aqueles indivíduos heterozigotos ($FecX^{G+}$) apresentarão

fragmentos de 141pb, 111pb e 30pb, e os indivíduos homozigotos ($FecX^{GG}$) apresentarão apenas o fragmento não cortado com 141pb.

e) Análise estatística

Os dados referentes às bandas encontradas em cada grupo animal foram analisados com relação à sua frequência e relacionados com o fenótipo de prolificidade.

RESULTADOS

As raças Santa Inês e Morada Nova, têm sido referidas como prolíficas, para as condições do Semi-árido Nordeste. Em nosso estudo, encontramos índices de prolificidade igual a 2.39 a 2.13 respectivamente, entre as escriturações, de ao menos um parto com múltiplas crias, no histórico de três partos consecutivos (Tab.1).

Tabela 1 - Número médio de crias/parto para as raças Morada Nova e Santa Inês com histórico de partos gemelares

Genótipo	Raças	
	Morada Nova	Santa Inês
No. de amostras	112	181
Nº de crias/parto	2,13	2,39

É importante notificar que, para a raça Morada Nova, 40% dos plantéis visitados consistiam de fêmeas com histórico de pelo menos um parto gemelar. O que não ocorreu no caso dos rebanhos Santa Inês visitados, os quais tiveram um índice de 25 % de fêmeas com partos gemelares.

Nesse estudo, não foram encontradas mutações referentes ao gene Galway $FecX^G$, nas duas raças estudadas. Pela técnica PCR-RFLP, todas as bandas selvagens foram cortadas pela enzima *Hinf* I (G/ACT) resultando fragmentos de 111pb, o que caracteriza uma ausência de mutação para o gene $FecX^G$ (Fig. 1).

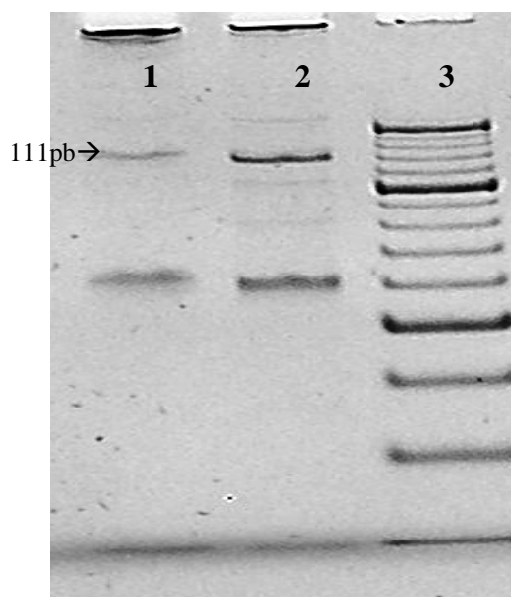


Figura 1- Resultado de PCR-RFLP – Gel poliacrilamida a 8% - para *FecX^G* digerido com endonuclease *Hinf I*. 1 e 2= amostras Morada Nova e Santa Inês, respectivamente. 3= DNA Ladder 10pb.

DISCUSSÃO

Devido ao sistema de criação extensivo, durante as visitas às propriedades, observou-se que os criadores não valorizam fêmeas prolíficas, justificando a dificuldade de manejo no sistema de cria a pasto. Percebe-se assim, a necessidade de se oferecer mais informações, junto aos criadores, quanto aos benefícios, em termos de ganho de produção, quando há um manejo eficiente dessas fêmeas diferenciadas quanto à prolificidade. Apesar desta característica não ser bem aceita para o sistema de criação extensivo, 40% dos exemplares de Morada Nova, constituíam-se de fêmeas com histórico de ao menos um parto com múltiplas crias. Observando-se assim, a prolificidade como uma característica inerente à essa raça.

Nesse estudo, reproduzindo-se a técnica PCR-RFLP citada por Hanrahan et al. (2004), para investigação da mutação referente ao gene BMP15, loci *FecX^G*, não foi constatada esta mutação nas raças Santa Inês e Morada Nova. Por sua vez, estudos recentes de Chu et al. (2007), apresentaram a raça Han, asiática, como portadora de mutações simultâneas (*FecB* e *FecX^G*). Davis et al. (2006), também não encontraram

essas mutações quando estudaram vinte e uma das raças e linhagens mais prolíficas do mundo. Entre elas, na raça Han, para a qual foi observada a mutação *FecB*, não foi constatada a presença da mutação *FecX^I* (Inverdale).

Já Kumar et al. (2008) citaram a ocorrência do gene Booroola em ovelhas indianas da raça Kendrapada, com histórico de prolificidade, quando investigaram, simultaneamente, os genes *BMPR-1B* (*FecB*) e *BMP15* (*FecX^G*). Contudo, assim como no presente trabalho, não foram encontradas mutações relativas ao gene *FecX^G* (Galway).

Com relação a estudos realizados, no Brasil, em genes maiores ligados à prolificidade, Castro et al. (2006) caracterizaram um novo SNP (polimorfismo de um só nucleotídeo) localizado no gene *GDF-9*, na raça Santa Inês e inferiram que o polimorfismo do SNP 1034 observado pode estar relacionado à alta frequência de ovulação, característica dessa raça.

Por sua vez, ainda não foram descritos estudos com relação à investigação do gene *FecX* nessas raças aqui trabalhadas, assim como ainda não foram realizados levantamentos para esse gene em nenhuma raça brasileira. Por tanto, percebe-se a necessidade de mais estudos para se investigar a possibilidade de existência de outras mutações relativas à prolificidade para a raça Santa Inês, bem como em suas raças formadoras, como a Morada Nova.

Como, nesse experimento, não foram encontradas mutações relativas ao gene *FecX^G*, percebe-se que a utilização de levantamentos relacionados a essas mutações, como marcador para a prolificidade, com a metodologia aqui empregada, não constitui uma ferramenta adequada, para uso comercial, em programas de melhoramento, para essa característica, nessas raças estudadas. Deve ser considerado que existam pesquisas sobre filogenia, em ovinos, baseadas em investigação de polimorfismos, comuns entre raças ou linhagens. Entre eles o gene Booroola, já descrito, tem sido escolhido para realização desses estudos de mapas de ligação.

Segundo Crawford et al. (1994), os mapas de ligação são uma importante ferramenta para identificação de genes associados a características de produção em animais de grande porte (*Production traits*). Os programas de seleção em animais domésticos, baseados em mensuração fenotípica, têm melhorado e um entendimento da estrutura e função dos genomas dos animais domésticos providos por mapas genéticos oferecem a oportunidade de serem identificadas as variações responsáveis pelas diferenças de desempenho produtivo. Os marcadores moleculares, ligados a características herdáveis, irão possibilitar uma seleção mais rápida de animais elite e,

eventualmente, permitir a identificação desses genes que influenciam a expressão genética.

Dias-Tascón et al. (2001) citam que durante os últimos anos, se tem alcançado um importante avanço na elaboração dos mapas genéticos das espécies domésticas. Em particular, os mapas de ligação, obtidos mediante estudos de segregação familiar, têm experimentado um importante impulso com o aparecimento dos marcadores do tipo microssatélite. A principal característica desses marcadores é seu elevado polimorfismo, sendo utilizados como *loci* “chave” de referência na integração dos mapas físicos e de ligação.

CONCLUSÕES

Na ausência da mutação *FecX^G* nas raças Santa Inês e Morada Nova que possuem histórico de prolificidade, devem ser investigados outros marcadores, particulares às mesmas, os quais possam explicar a herança dessa característica para os seus descendentes. A investigação de mutações relativas ao gene Galway, *loci FecX^G*, nas raças Santa Inês e Morada Nova, como ferramenta de seleção assistida para prolificidade, não constitui uma opção adequada para uso comercial em programas de melhoramento para essa característica.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi conduzido com o suporte financeiro da FACEPE e Bolsa CAPES / FACEPE. Agradecemos aos produtores de ovinos do Semi-árido nordestino, que cederam seus animais para obtenção do material desta pesquisa.

REFERÊNCIAS

BANCO DO NORDESTE DO BRASIL Relatório Social Banco do Nordeste do Brasil. In: WORKSOHP SOBRE CAPRINOS E OVINOS TROPICAIS. 1998, Fortaleza. **Proceedings...** Fortaleza: BNB, 1998, p. 20-23.

BARROSO, D. D. Vinho para engordar ovinos. **O Berro**, Uberaba, v. 71, p.12-13, 2004.

CASTRO, E. A. et al. Characterization of a new SNP in the Growth and Differentiation Factor 9 (GDF-9) gene, specific for the brasilian Santa Inês sheep. In: WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION, 8., 2006, Belo Horizonte, Brasil. **Anais...** Belo Horizonte: [s.n.], 2006 p.13-18.

CHU, M. X. et al. Association between PCR-SSCP of Bone Morphogenetic Protein 15 gene and prolificacy in Jining Grey goats, **Animal Biotechnology**, Beijing, v.18, n.4, p. 263-274, 2007.

CRAWFORD, A. M. et al. Sheep Linkage Mapping Nineteen Linkage Groups Derived From the Analyses of Paternal Half-Sib Families, **Genetics**, Bethesda, v. 137, p. 573-579, 1994.

DAVIS, G. H, Major gene affecting ovulation rate in sheep. **Genetics Selection Evolution**, v.37, suppl.1, p.11-23, 2004.

DAVIS, G. H. et al. Investigation of the Booroola (*FecB*) and Inverdale (*FecXI*) mutations in 21 prolific breeds and strains of sheep sampled in 13 countries. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 92 , n. 1 - 2, p. 87 – 96, 2006.

DAVIS, G. H. et al. Combined effect of the inverdale and Booroola Prolificacy genes on ovulation rate in sheep. In: Proceedings of 13th Conference of the Association for the Advancement in Animal Breed and Genetic, v. 13, p.74-77, 1999.

DAVIS G.H. et al. Evidence that an imprinted gene on the X chromosome increases ovulation rate in sheep. **Biology of Reproduction**, Champaign, v.64, p.216-221, 2001.

DAVIS, G. H. et al.. Evidence for the presence of a major gene influencing ovulation rate on the X-chromosome of sheep. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 44, p. 620-624, 1991.

DIAS-TASCÓN, C. et al. **Estudio de las relaciones de ligamiento entre microsatélites del cromosoma 6 em el ganado ovino de raza churra**. 2001. disponível em <[HTTP://acteon.webs.upv.es/CONGRESOS/Aida2001/does/diez-t.pdf](http://acteon.webs.upv.es/CONGRESOS/Aida2001/does/diez-t.pdf)> Acessado em dezembro de 2008.

GALLOWAY, S. M. et al. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. **Nature Genetics**, New York, v.25, n.3, p.279-283, 2000.

HANRAHAN, J. P. et al. Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*). **Biology of Reproduction**, Champaign, v.70, p.900-909, 2004.

KUMAR, S. et al. Screening for Booroola (*FecB*) and Galway (*FecX^G*) mutations in Indian sheep, **Small Ruminant Research**, London, v. 80, n. 1-3, p. 57-61, 2008.

MANIATIS, T.; FRITSCH, E.F; SAMBROOK, J. (Ed.) **Molecular cloning a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. v.3, n.1, P.1-3

OTSUKA, F. et al. Bone morphogenetic protein-15 inhibits follicle-stimulating hormone (FSH) action by suppressing FSH receptor expression. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda. v.276, n.14, p.11387-11392, 2001.

PIPER, L.R.; BINDON, B.M. The Booroola Merino and the performance of médium non-Peppin crosses at Armindale. In PIPPER LR; BINDON BM, NETHERY RD (Ed.), **The Booroola Merino**. Melbourne: CSIRO. 1982. p. 9-19.

SIMPLÍCIO, A. A. Desafios e oportunidades do Santa Inês. **O Berro**, 2008, Uberaba, Disponível em: <<http://www.revistaberro.com.br/?materiais/ler,968>> Acesso 24 nov 2008.

SOUSA, W., **Genética do Santa Inês cada vez mais passa por melhorias na PB** 2008. Disponível em: <http://www.paraiba.pb.gov.br/index.php?option=com_content&task=view&id=27647&Itemid=2> Acesso 12 nov 2008.