

# Estudo molecular no controle da taxa de ovulação em ovinos da raça Santa Inês

Edylaine Almeida Castro\*

Carlos Frederico Martins\*\*

Eduardo de Oliveira Melo\*\*\*

## Resumo

O gene GDF-9 é um dos primeiros genes expressos pelo ovócito ainda no folículo primordial e exerce grande influência no controle das fases iniciais da foliculogênese. Trabalhos realizados demonstraram que uma mutação pontual “High Fertility” encontrada neste gene foi correlacionada ao aumento da taxa de ovulação em ovelhas de raças européias quando em heterozigose e à infertilidade quando em homozigose, devido a uma deficiência no desenvolvimento dos folículos primários. Os animais selvagens não mostram nenhuma alteração reprodutiva. Posteriormente, foi identificada, na raça de ovelha naturalizada brasileira, Santa Inês, nova mutação no gene GDF-9, que pode estar envolvida com aumento da taxa de ovulação. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi verificar a existência de Polimorfismo de Nucleotídeo Simples (SNP) na raça Santa Inês e observar se há alteração em sua taxa de ovulação.

**Palavras-chave:** Gene GDF-9. Taxa de ovulação. Ovelha Santa Inês.

## 1 Introdução

O estudo molecular voltado à reprodução animal e às raças de ovinos brasileiras é uma área de pesquisa muito relevante no Brasil, pois, além

---

\* Aluna de Biomedicina e do Programa de Iniciação Científica do UniCEUB.  
Email: edylainecastro@yahoo.com.br.

\*\* Professor de Embriologia do UniCEUB e Pesquisador da Embrapa Cerrados.  
Email: carlos.frederico@cpac.embrapa.br.

\*\*\* Pesquisador da Embrapa Cenargen. Email: eom@cenargen.embrapa.br.

de servir como modelo para estudos de doenças reprodutivas em humanos, é muito importante para a conservação de recursos genéticos na produção pecuária e na recuperação de raças em extinção. No Brasil, existem várias raças de animais que se desenvolveram a partir de outras raças trazidas por colonizadores portugueses após o descobrimento do Brasil. Após alguns séculos, essas raças passaram por seleção natural, apresentando características próprias, relativas à nova condição a que estavam sendo submetidas. Entre as várias raças de ovinos naturalizados, destaca-se a raça Santa Inês.

Na população da raça Santa Inês, foi observada alta frequência de animais com partos múltiplos, principalmente duplos, que podem ser selecionados e ter esse mecanismo de prolificidade estudado quanto à determinação de genes como o efeito principal.

Nos ovinos, existem vários genótipos prolíficos em que essa característica é determinada por mutações nos genes de fatores de crescimento da superfamília do fator de crescimento transformante beta (TGF -  $\beta$ ) ou de seus receptores. O fator de crescimento expresso nos ovócitos de ovelhas e demais mamíferos, denominado de fator de crescimento e diferenciação nove (GDF - 9), é fundamental para a foliculogênese e ovulação. Por esse motivo, é o gene de escolha para este tipo de estudo. Trata-se de um dos primeiros genes expressos pelo ovócito, determinante no controle das fases iniciais da foliculogênese, na proliferação das células da granulosa e da teca em mamíferos (SHIMASAKI et al., 2004), e, ao ser inativado, pode levar à infertilidade pela perda da capacidade de ativação no crescimento dos folículos primordiais, o que ocorre nos animais homozigotos (DONG et al., 1996), e, ainda, ao aumento na taxa de ovulação de ovelhas de raças européias quando em heterozigose.

O gene GDF - 9 é constituído de 2 exons. O segundo exon contém mais de 70% da seqüência do quadro de leitura da proteína, em que se encontram 135 aminoácidos da porção C - terminal, formadores do peptídeo maduro, cujo processamento e dimerização dão origem ao hormônio GDF - 9 ativo (SHIMASAKI et al., 2004; INCERTI et al., 1994).

Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi verificar a existência de relação entre a presença de um alelo do gene GDF - 9, contendo o polimor-

fismo de nucleotídeo simples (SNP), e o aumento na taxa de ovulação das ovelhas da raça Santa Inês.

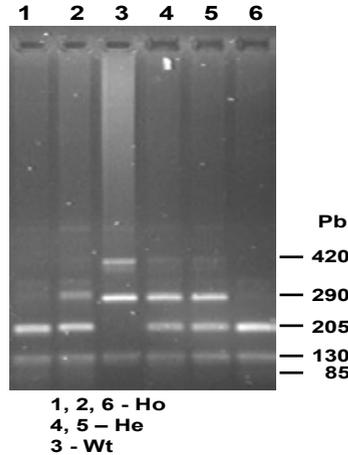
## **2 Material e Métodos**

Este estudo foi desenvolvido no Laboratório de Genética Molecular Animal da Embrapa Cenargen, com o apoio do Programa de Iniciação Científica do UniCEUB (PIC). Foram utilizadas amostras de sangue de 23 ovelhas da raça Santa Inês, provenientes da região Nordeste, com histórico de partos múltiplos; 56 ovelhas também da região Nordeste, mas sem histórico reprodutivo; e 172 ovelhas da região de Brasília, sem histórico reprodutivo.

A metodologia utilizada consistiu em extrair o DNA genômico de 251 ovelhas da raça Santa Inês, pelo método “salting-out” (BIASE et al., 2002), a partir da fração leucocitária do sangue. Com o DNA genômico foi realizada a amplificação do exon – 2 do gene GDF – 9, utilizando a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR: “Polymerase Chain Reaction”) em um termociclador. A reação de PCR amplificou esse fragmento de forma exponencial. Para tal objetivo, foram utilizados os reagentes determinados com quantidades adequadas, entre os quais podemos citar: MgCl<sub>2</sub>, dNTPs (mix das bases guanina, citosina, timina adenina), enzima Taq Polimerase e “primers” específicos (sense 5’ – GGA GAA AAG GGA CAG AAG C – 3’; anti – sense 5’ ACG ACA GGT ACA CTT AGT – 3’). As etapas do programa do termociclador foram de: 93°C/3 minutos com 35 (trinta e cinco) ciclos de 93°C/40 segundos, 56°C/40 segundos, 72°C/40 segundos e uma extensão final de 72°C/5 minutos. O produto final de PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose.

Esse produto de PCR passou por uma digestão, em que uma alíquota do produto e uma quantidade específica da enzima de restrição TspRI foram incubadas “overnight”, em temperatura de 65°C. Após a digestão, o produto passou por um sistema de choque térmico, sendo aquecido por 15 (quinze) minutos à temperatura de 80°C e imediatamente resfriado à temperatura de 4°C. Logo após o choque térmico, foi realizada a análise do produto de digestão por meio da eletroforese em gel de agarose, obtendo-se, dessa forma, o genótipo desses animais (Figura 1 - Gel de Agarose com a análise dos seus alelos).

Figura 1 - Gel de Agarose com a análise dos seus alelos (Wt: selvagem; He: heterozigoto; Ho: homozigoto)



### 3 Resultados e Discussão

Um total de 251 ovelhas da raça Santa Inês foram genotipadas e os resultados analisados pelo método estatístico de qui-quadrado. Foi realizada uma seleção de 23 ovelhas do Nordeste que apresentaram um histórico de prolificidade com partos múltiplos (duplos, em sua maioria, e outras com triplos), sendo observada uma grande quantidade de animais heterozigotos (14) e homozigotos (5), em relação à quantidade de selvagens (4). Paralelamente, foram genotipadas duas outras populações não selecionadas de acordo com seu histórico, ou seja, desconsiderando se tinham ou não partos múltiplos. Entre as 56 ovelhas Santa Inês da região Nordeste e 172 ovelhas da região de Brasília, foi observada distribuição genotípica distinta em relação às que foram selecionadas de acordo com sua alta prolificidade. A maioria desses animais foi identificada como selvagem, sendo 35 animais da região Nordeste e 114 animais da Região de Brasília. Os outros animais foram classificados da seguinte forma: 19 animais do Nordeste e 53 animais de Brasília foram heterozigotos; 2 animais no Nordeste e 5 de Brasília foram homozigotos (Tabela 1 - Distribuição genotípica das ovelhas Santa Inês em três populações).

Observa-se que a frequência do alelo selvagem é maior nos animais de Brasília.

lia e do Nordeste, em relação aos selecionados de acordo com seu histórico de prolificidade, o que é um forte indício de que a mutação pode estar alterando a taxa de ovulação entre esses animais. Quando se analisa a frequência alélica, observa-se uma frequência de 0,7946 para os animais do Nordeste e de 0,8169 para os de Brasília que são selvagens para a mutação, sobrepondo a frequência dos animais mutantes que é de 0,2054 e de 0,1831, respectivamente, nas ovelhas que não foram selecionadas de acordo com o seu histórico. Já na população do Nordeste, que foi escolhida de acordo com seu histórico de prolificidade, observou-se frequência alélica de 0,5217 de animais mutantes, sobrepondo os selvagens que tiveram uma frequência alélica de 0,4783 (Tabela 2).

Tabela 1 - Distribuição genotípica das ovelhas Santa Inês em três populações (Wt: selvagem; He: heterozigoto; Ho: homozigoto)

<b>População Sta. Inês</b>	<b>Wt</b>	<b>He</b>	<b>Ho</b>	<b>N</b>
<b>Nordeste <sup>a</sup> (parto múltiplo)</b>	<b>4</b>	<b>14</b>	<b>5</b>	<b>23</b>
<b>Nordeste <sup>b</sup> (não-selecionada)</b>	<b>35</b>	<b>19</b>	<b>2</b>	<b>56</b>
<b>Brasília <sup>b</sup></b>	<b>114</b>	<b>53</b>	<b>5</b>	<b>172</b>

$\chi^2 (P < 0.01)$

Tabela 2 - Frequência dos alelos selvagem (Wt) e mutante (Mut).

<b>Frequência Alélica</b>	<b>Wt</b>	<b>Mut</b>
<b>Nordeste (Mmúltiplo)</b>	<b>0.4783</b>	<b>0.5217</b>
<b>Nordeste (Não-sel)</b>	<b>0.7946</b>	<b>0.2054</b>
<b>Brasília</b>	<b>0.8169</b>	<b>0.1831</b>

## 4 Conclusão

De acordo com os resultados obtidos nesta pesquisa, pode-se inferir, em razão tanto da quantidade de animais heterozigotos para a mutação na população selecionada e não selecionada quanto da frequência alélica desses, que há possibilidade de a mutação estar alterando a taxa de ovulação desses animais, contribuindo para maior prolificidade. Esses resultados corroboram com as informações de Shimasaki et al. (2004).

A quantidade de animais homozigotos para a mutação e sua frequência alélica, na população selecionada e na não selecionada, fornece indícios sobre a infertilidade desses animais. Pelo fato de o GDF-9 ser um dos primeiros genes expressos pelo ovócito, sendo determinante no controle das fases iniciais da foliculogênese, na proliferação das células da granulosa e do cumulus, que darão subsídios de nutrientes e sinais reguladores de amadurecimento citoplasmático e nuclear, esses animais poderão apresentar uma deficiência no desenvolvimento de seus folículos primários.

Os animais que são selvagens não possuem alteração na sua competência ovocitária, não apresentando vantagem ou desvantagem em relação à ovulação. Porém, os animais heterozigotos, que possuem a mutação, apresentarão uma maior prolificidade, pois terão um aumento na capacidade de ovulação.

Finalmente, este estudo relaciona o gene GDF – 9 ao processo de ovulação. Nessa perspectiva, justifica-se por ser uma ferramenta de grande valia a estudos de fertilidade de rebanhos, por revelar grande eficácia nas biotécnicas de multiplicação animal e, também, por constituir-se em fonte inestimável de modelo para estudos referentes a problemas reprodutivos em humanos.

## **Molecular study in the control of ovulation rate in ovine of Santa Ines Breed**

### **Abstract**

The GDF-9 gene is one of the first expressed genes by oocyte in the primordial follicle and is very important in the control of the initial foliculogenesis phases. Others studies demonstrated that a punctual mutation found in this gene is cor-

related to the increase of ovulation rate in European sheep, when in heterozygosis and infertility when in homozygosis, due to a deficiency in the development of the primary follicles. The wild animals don't show any reproductive alteration. Later was identified in the Santa Inês sheep (Brazilian naturalized breed), a new mutation in the GDF-9 gene that can be involved with increase of ovulation rate. Then, the objective this work went verify to existence of Single nucleotide polymorphism (SNP) in this breed and to identify possible alteration in the ovulation rate.

**Keywords:** GDF-9 gene. Ovulation rate. Santa Inês sheep.

## Referências

- BIASE, F. H. et al. Protocol for extraction of genomic DNA from swine solid tissues. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 25, n. 3, p. 313-315, 2002.
- DONG, J. et al. Growth differentiation factor-9 is required during early *ovarian folliculogenesis*. **Nature**, Inglaterra, v. 383, p.531-535, 1996.
- INCERTI, B. et al. Structure of the mouse growth/differentiation factor 9 gene. **Biochimica et Biophysica Acta**, Holanda, v. 1222, p.125-128, 1994.
- SHIMASAKI, S. et al. The bone morphogenetic protein system in *Mammalian* reproduction. **Endocrine reviews**, Estados Unidos, v. 25, p. 72-101, 2004.