

**Associação entre polimorfismo no gene *BMP4* e características de OPU-PIVE em vacas Gir**

**Wilder Hernando Ortiz Vega<sup>1</sup>, Celia Raquel Quirino<sup>2</sup>, Amanda Silva de Azevedo<sup>3</sup>, Aline Pacheco<sup>4</sup>, Clara Slade Oliveira<sup>5</sup>, Raquel Varella Serapião<sup>6</sup>, Aylton Junior Bartholazzi<sup>7</sup>**

<sup>1</sup> Doutorando Ciência animal CAPES – UENF Rio de Janeiro, Brasil –Email: [wilortvet@yahoo.es](mailto:wilortvet@yahoo.es)

<sup>2</sup> Professora do Laboratório de reprodução e melhoramento genético animal – UENF. Bolsista CNPq. Rio de Janeiro, Brasil

<sup>3</sup> Bolsista de Universidade Aberta, PROEX – UENF

<sup>4</sup> Bolsista Pós Doutorado CAPES/FAPERJ – UENF, Rio de Janeiro, Brasil

<sup>5</sup> Clara Slade Oliveira EMBRAPA Gado de Leite, CESM, Valencia RJ

<sup>6</sup> Raquel Varella Serapião, PESAGRO-RIO Valencia RJ

<sup>7</sup> Aylton Junior Bartholazzi. Bolsista de Mestrado CAPES – UENF

**Resumo:** A Proteína Morfogênica do Osso 4 (*BMP4*) é um membro do fator de crescimento transformante beta (TGF $\beta$ ); superfamília que controla inúmeros eventos do desenvolvimento embrionário, fetal e até mesmo de adultos em todos os vertebrados. O objetivo deste estudo foi avaliar o grau de associação entre um polimorfismo no gene *BMP4* e características relacionadas à produção de embriões *in vitro*, bem como a prenhez após transferência. O DNA foi extraído de folículos pilosos de 50 vacas Gir doadoras de oócitos, a genotipagem foi realizada por PCR-RFLP. Foram coletados dados de 212 sessões de OPU-PIVE. As características da OPU-PIVE associadas ao marcador SNP foram: número e proporção dos complexos cumulus-oócitos viáveis, número e proporção de embriões clivados no dia 4 de cultura, número e proporção de embriões transferíveis no dia 7 de cultura, número e proporção de prenhez no dia 30 após a transferência e, número e proporção de prenhez no dia 60 após a transferência. Foi feita análise de variância utilizando PROC GLIMMIX do SAS 9.2, para avaliar o efeito do polimorfismo sobre as características estudadas. O polimorfismo apresentou associação significativa ( $P < 0,01$ ) com número e proporção dos complexos cumulus-oócitos viáveis e proporção de prenhez aos 30 dias. O genótipo mutante (GT) afetou negativamente características como número e proporção dos complexos cumulus-oócitos viáveis e proporção de prenhez aos 30 dias.

**Palavras-chave:** OPU-PIVE, SNP, mutação sinónima

**Associação entre polimorfismo no gene *BMP4* e características de OPU-PIVE em vacas Gir**

**Abstract:** Bone Morphogenic Protein 4 (*BMP4*) is a member of the transforming growth factor beta (TGF $\beta$ ); superfamily that controls many events in embryonic, fetal and adult development even in all vertebrates. The aim of this study was to evaluate the degree of association between a polymorphism in *BMP4* gene related to the of embryo *in vitro* production traits, and pregnancy after transfer. DNA was extracted from hair follicles 50 Gyr cows donor oocytes, genotyping was performed by PCR-RFLP. Database of 212 OPU- IVP sessions were collected. The characteristics of OPU- IVP associated marker SNP were: number and proportion of cumulus -oocyte complexes viable, number and proportion of cleaved embryos on day 4<sup>th</sup> of culture, the number and proportion of transferable embryos on day 7<sup>th</sup> of culture, the number and proportion of pregnancies on day 30 after transfer, and the number and proportion of pregnancies on day 60 after transfer. ANOVA using PROC GLIMMIX of SAS 9.2 to evaluate the effect of the polymorphism on the characteristics studied was made. The polymorphism was significantly associated ( $P < 0.01$ ) with number and proportion of cumulus -oocyte complexes viable and proportion of pregnancies at 30 days. The mutant genotype (GT) adversely affects characteristics such as number and proportion of cumulus -oocyte complexes viable and proportion of pregnancies at 30 days.

**Keywords:** OPU-IVP, SNP, mutation synonymous

**Introdução**

Variabilidade nos resultados em diferentes trabalhos referentes aos índices de produção oocitária, taxas de prenhez e tipo de raça, entre outras, são evidentes quando se comparam dados de Produção *In vitro* de Embriões (PIVE) de diferentes vacas doadoras de oócitos (Pontes, et al., 2009).

La Rosa et al., (2011) concluíram que *BMP4* está implicado na maturação de oócitos bovinos com efeitos sobre as taxas de clivagem e estado pluripotente da célula embrionária. Outro estudo relatou associação entre Polimorfismo de um Único Nucleotídeo (SNP) no gene *BMP4* e taxa de blastocistos em vacas da raça Holandesa avaliadas por modelo *in vitro* (Li et al., 2012). As diferenças genéticas entre *Bos taurus* e *Bos taurus indicus* foram confirmadas nos estudos de associação genômica para diferentes características de interesse econômico, quando SNPs associados com locus de características quantitativas (QTLs) no grupo taurino, não sendo significativos no grupo indicus. (Canavez, et al., 2012, Höglund, et al., 2012). Não existe nenhuma pesquisa envolvendo polimorfismo no gene *BMP4* e características de produção *in vitro* de embriões (OPU -PIVE) em vacas da raça Gir brasileira, por tanto o objetivo do presente estudo foi avaliar o grau de associação entre o polimorfismo no gene *BMP4* e características de OPU-PIVE em vacas Gir.

### Material e Métodos

O DNA foi extraído a partir de foliculos pilosos por método alcalino. Foram coletados dados de 212 OPU-PIVE sessões de 50 doadoras de oócitos Gir durante os anos de 2012 e 2013 no estado do Rio de Janeiro, Brasil. As características da OPU-PIVE associadas ao marcador SNP foram: Número e proporção de complexos cumulus-oócitos viáveis (Nvcoc e Pvcoc), 2. Número e proporção de embriões clivados no dia 4 de cultura (Ncleavd4 e Pcleavd4), 3. Número e proporção de embriões transferíveis no dia 7 de cultura (Ntembd7 e Ptembd7), 4. Número e proporção de prenhez no dia 30 após a transferência (NPrD30 e PPrD30) e 5. Número e proporção de prenhez no dia 60 após a transferência (NPrD60 e PPrD60). A reação em cadeia da polimerase de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (PCR-RFLP) foi utilizada para a genotipagem de amostras amplificadas. Para confirmar a reação de digestão, o produto foi separado em gel de poli-acrilamida (8%) e corado com nitrato de prata. Após esta visualização, as amostras foram submetidas à eletroforese capilar, usando o equipamento Fragment Analyzer™ (Advanced Analytical) para a discriminação alélica por tamanho e identificação do polimorfismo. A associação entre o marcador de DNA, e características da OPU-PIVE e taxas de prenhez foi determinada pela análise de variância de dados repetidos utilizando o procedimento PROC GLIMMIX do SAS (2009).

### Resultados e Discussão

O gel de eletroforese capilar e o eletroferograma da mutação G>T no gene *BMP4* são mostrados na Figura 1. Os alelos de 75pb e 105pb foram obtidos após clivagem com a enzima de restrição; o alelo mutante não foi clivado porque o local de reconhecimento estava ausente e o tamanho do alelo foi 187pb, portanto, conclui-se que a mutação encontrava-se em heterozigose.

Três genótipos foram identificados (GG, TT e GT) com frequências genótípicas de 0.64, 0.32 e 0.04, respectivamente. A análise de variância do Polimorfismo sobre as características de OPU-PIVE e as taxas de prenhez no locus analisado no gene *BMP4* mostrou efeito significativo para o genótipo (GT) nas características número e proporção de complexos cumulus-oócitos viáveis (Nvcoc e Pvcoc) e, proporção de prenhez aos 30 dias (PPrD30). Médias para o genótipo GT apresentaram desempenho inferior nas características acima anotadas no nível de probabilidade de 1%.

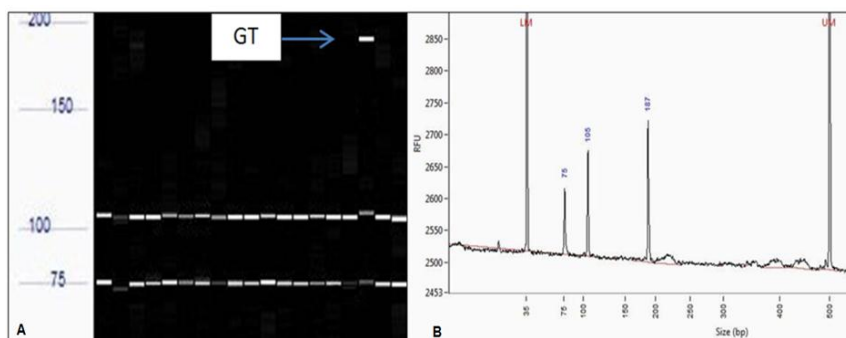


Figura 1. Gel de eletroforese capilar (A) e eletroferograma (B) de PCR-RFLP. O genótipo GT mostra dois fragmentos para o alelo clivado (75pb e 105pb) e um no alelo não clivado 187pb. (Mutação em heterozigose).

Os animais com a mutação G > T no gene *BMP4* apresentaram 4.29 oócitos viáveis a menos em comparação com o genótipo GG, 16.23% menor proporção de oócitos viáveis que o genótipo TT, e os embriões transferidos de vacas com genótipo GT tiveram 26.5% menor taxas de prenhez aos 30 dias, em comparação com o genótipo TT.

Li, et al., (2012), utilizando modelo *in vitro* em vacas Holandesas mostraram resultados similares para a mutação G>T no gene *BMP4*. Eles concluíram que os embriões produzidos a partir de vacas genótipo TT apresentaram 10.5 e 16.1% taxas de blastocistos mais altas do que as vacas GG e GT, respectivamente. Os mesmos autores mostraram que a taxa de blastocistos foi significativamente associada com SNP rs109778173 de *BMP4* ( $P = 0.006$ ), enquanto que a associação com a taxa de fertilização não foi estatisticamente significativa ( $P = 0.095$ ).

#### Conclusões

A associação entre o polimorfismo do gene *BMP4* e características de OPU-PIVE em bovinos da raça Gir estudados, confirmaria a influência deste gene no desenvolvimento do embrião e nas taxas de fertilização após a transferência de embriões.

O genótipo GT afetou negativamente as características como o número e proporção de complexos cumulus-oócitos viáveis, e proporção de prenhez no dia 30 após a transferência na população estudada. Este achado poderia ser uma indicação de um efeito genético nessas características.

A mutação sinônima G>T no gene *BMP4* deve ser estudada para elucidar os mecanismos envolvidos na alteração dos índices de desenvolvimento embrionário e de prenhez em vacas da raça Gir doadoras de oócitos da citada população.

#### Literatura citada

LA ROSA, I., CAMARGO, L. S.; PEREIRA, M. M., FERNANDEZ-MARTIN, R., PAZ, D. A., & SALAMONE, D. F. Effects of bone morphogenic protein 4 (BMP4) and its inhibitor, Noggin, on *in vitro* maturation and culture of bovine preimplantation embryos. **Reproductive Biology and Endocrinology**, 9:18. . (2011).

LI, G.; KHATEEB, K.; SCHAEFFER, E.; ZHANG, B.; KHATIB, H. Genes of the transforming growth factor-beta signaling pathway are associated with pre-implantation embryonic development in cattle. **Journal of Dairy Research**. 79 310–317, (2012)

PONTES, J., NONATO-JUNIOR, I., SANCHES, B., ERENO-JUNIOR, J., UVOA, S., BARREIROS, T., et al. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between *in vivo* and *in vitro* methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. **Theriogenology**, 71 690–697, (2009).

CANAVEZ, F., LUCHE, D., STOTHARD, P., LEITE, K., SOUSA-CANAVEZ, J., PLASTOW, G., e outros . Genome sequence and assembly of *Bos indicus*. **Journal of Heredity**, 103, 342–348, (2012).

Höglund, J. K., Guldbbrandtsen, B., Lund, M. S., & Sahana, G. Analyzes of genome-wide association follow-up study for calving traits in dairy cattle. **BMC Genetics** , 13:71,(2012).