

# MARCADORES MOLECULARES NO MAPEAMENTO DO GENOMA CAPRINO E OVINO

Adriana Mello Araújo  
Pesquisadora da EMBRAPA-CNP Caprinos, Sobral, Ceará  
Doutoranda do Departamento de Zootecnia  
Universidade Federal de Viçosa

## MAPEAMENTO DO GENOMA CAPRINO

O primeiro mapa genético de caprinos foi desenvolvido, baseado na estratégia de explorar o curto tempo evolucionário entre as espécies caprina, ovina e bovina - cerca de 8 e 17 milhões de anos, respectivamente e, portanto, as homologias existentes entre estas espécies de ruminantes (Vaiman et al., 1996). Segundo os autores, 43% e 34% dos loci marcadores de ovinos e bovinos testados foram amplificados e informativos em caprinos, possibilitando o enriquecimento do mapa de ligação de caprinos.

As principais características comparativas do cariotipo entre as três principais espécies de ruminantes domésticos são (Hayes et al., 1991): (1) a fusão Robertsoniana do centrômero em ovinos, diferindo de caprinos e bovinos. Os cromossomos 1, 2 e 3 de ovinos são equivalentes à fusão dos cromossomos 1 e 3; 2 e 8; 5 e 11 de bovinos ou caprinos; (2) a translocação 9-14 diferenciando a família *Bovinae* e *Caprinae*; (3) o rearranjo intracromossomal do X, onde o braço Xp em bovinos corresponde ao Xq em caprinos e ovinos (De León et al., 1996).

Vaiman et al. (1996) estabeleceram o primeiro mapa genético de baixa resolução para o genoma caprino. O tamanho do genoma estimado foi de 3250 cM, cobrindo mais de 80% do comprimento total do genoma ou 2300 cM, com espaçamento médio entre marcadores de 16.1 cM.

Schibler et al. (1998) realizaram um estudo de mapeamento comparativo integrado de primatas/ruminantes, estabelecido em caprinos. Este mapa constitui um esforço para definir regiões homólogas a loci economicamente relevantes em ruminantes, facilitando a ligação de genes candidatos dentro de segmentos de DNA limitados do cromossomo. O mapa de segunda geração de caprinos cobriu 2737 cM, compreendendo mais de 88% do genoma da espécie e fornece um intervalo entre marcas de aproximadamente 10 cM.

Existem no banco de dados da espécie caprina (<http://locus.jouy.inra.fr>) 3814 loci descritos, sendo 306 genes No GoatMap foram identificados 123 loci homólogos à ovinos e 275 homologias com bovinos.

### O Locus PIS

O locus que determina o caráter mocho foi localizado nas três maiores espécies de ruminantes domésticos não sendo, contudo, identificadas homologias (Vaiman et al., 1999). Apenas na espécie caprina a ausência de chifres (dominante) é relacionada com intersexualidade (recessivo). Não foi observada recombinação entre os fenótipos, sugerindo que ambas as características são causadas por um único gene pleiotrópico ou por dois genes fortemente ligados.

O locus PIS (*polled intersex syndrome*) vem despertando interesse no mapeamento comparativo humano-caprino. Segundo Vaiman et al. (1997), cerca de 1 em cada 20.000 humanos nascidos têm problemas com cariotipagem XX. Os indivíduos machos XX podem possuir seqüências de DNA provenientes do cromossomo Y, devido a troca de DNA durante a meiose. Entretanto, há casos de machos XX SRY-negativos, ou seja, não há DNA contendo seqüências SRY no genoma de machos XX, eliminando a hipótese de translocação do Y, indicando que o processo de diferenciação sexual está ligado a alguns genes autossomais, além de alguns genes já descritos nos cromossomos sexuais.

Estudos de intersexualidade em mamíferos domésticos podem ajudar a elucidar o mecanismo de diferenciação sexual em humanos, que parece ser muito complexo, envolvendo várias vias de regulação, inclusive envolvendo genes autossomais. Em caprinos, o gene dominante autossomal para ausência de chifres, no estado homozigoto, causa masculinização de todas as fêmeas.

Vaiman et al. (1997) procederam a análise de ligação em 12 pedigrees de cabras  $2n=60$ , XX, localizando

o gene PIS na região distal do cromossomo I (1q43). Neste mesmo estudo, procedeu-se a hibridização interespecífica com sondas oriundas de bibliotecas humanas, verificando-se que as sondas do cromossomo 3 humano hibridizam especificamente com o cromossomo 1 de caprinos.

Vaiman et al. (1999) refinaram este estudo através de um mapa comparativo de alta resolução do PIS, confirmando a localização homóloga ao locus PIS no HSA 3q23. Nesta região do genoma humano, localiza-se o gene BPSE (*Blepharophimosis Ptosis Epicanthus Syndrome*), uma digenia humana das gônadas, associada à excessiva produção epidérmica das pálpebras. Tal homologia sugere o BPES como potencial candidato ao homólogo para a síndrome caprina. Segundo os autores, chifres e pálpebras possuem, em parte, a mesma origem embrionária, o que corrobora para a homologia gênica. Vaiman et al. (1999) apontam que a resposta definitiva para responder a esta questão está na clonagem de um destes genes para observações fisiológicas, sendo que a suposição de homologia é, até então, puramente posicional. Dada a raridade da doença, o gene BPES não foi clonado e seqüenciado em humanos.

### Proteínas do leite

O leite de cabra produzido é quase totalmente processado em muitos países do mundo. A fabricação de queijo é baseada na liberação do domínio polar da caseína pela clivagem das ligações peptídicas, levando ao aumento da superfície hidrofóbica, o que leva à coagulação do leite. A produção de queijo de qualidade depende primeiramente da quantidade e tipo de caseína, que constituem cerca de 80% das proteínas totais do leite.

As proteínas do leite são muito estudadas, principalmente suas variantes protéicas identificadas através de eletroforese. Existem quatro tipos de caseína, a-s1, a-s2, b e k. Os genes que codificam todas são fortemente ligados, sendo transmitidas como um haplótipo. Sua localização no mapa genético é CHI 6q32 (Schibler et al., 1998).

Moioli et al. (1998) revisaram os polimorfismos protéicos e de DNA ligados às proteínas lácteas de caprinos e ovinos. Segundo os autores, os genes das proteínas lácteas possuem todas as qualidades para se tornarem genes candidatos para características leiteiras em caprinos e ovinos. Os genes da a-s1, a-s2, b e k caseína são polimórficos e com seqüências caracterizadas no DNA, através de RFLP ou PCR. As variantes mais estudadas são da a-s1 caseína, que possui os alelos A, B1, B2, B3, C, D, E, F, O. Estudos da década de 1980 evidenciam que o polimorfismo da a-s1 caseína é associado com as classes quantitativas: A, B e C, associadas com 3,6 g/alelo; E com 1,6 g, D e F com 0,6 g e O, associado com produção nula.

Na França, um dos principais objetivos do programa de seleção de reprodutores é a produção de proteínas lácteas. Assim, os reprodutores jovens, antes de completarem o teste de progêni, são genotipados para o locus da a-s1- caseína, eliminando os portadores de alelos desfavoráveis.

No Brasil, La Gioia et al. (1998a) estudaram a frequência alélica e genotípica dos alelos da a-s1 caseína em caprinos Saanen e Pardo Alpino, através de eletroforese SDS-PAGE. Foi possível identificar apenas quatro alelos, A, B, F e O, com frequências de 0,14; 0,21; 0,59; e 0,05, respectivamente. La Gioia et al. (1998b) estudaram a correlação entre os alelos da a-s1 caseína e características produtivas e reprodutivas em caprinos no Brasil, não obtendo diferença significativa entre os genótipos.

### Mapeamento do genoma ovino

O desenvolvimento do mapa de ligação é crítico para a espécie. Antes de 1994, apenas 17 marcas foram assinaladas em sete grupos sintênicos. Em 1995, como consequência de um projeto de mapeamento do gene *Booroola* de fecundidade, foi publicado o mais extensivo mapa de ligação, que continha 246 marcas (Crawford et al., 1995). Tal mapa cobria 2.070 cM, correspondendo aproximadamente 75% do genoma total, com marcas nos 26 cromossomos autossomais, espaçadas de 120-30 cM. Três anos depois, um mapa de segunda geração foi publicado, construído com 519 marcas e cobrindo 3.63 cM (DeGortai et al., 1998). O mapa de terceira geração foi desenvolvido com 1.062 loci (941 anônimos e 121 genes), oriundo da compilação do trabalho de genotipagem de 15 laboratórios (Madox et al., 2001), cobrindo 3.400 cM dos autossomais, com intervalo médio de 6,5 cM. O mapa contém poucos genes expressos devido à dificuldade de identificar variações alélicas necessárias para análise de ligação. A maioria das identificações gênica foi feita utilizando híbridos de células somáticas e hibridização *in situ*.

Trabalhos voltados para identificação de QTL incluem resistência à parasitas, fertilidade, características

de carcaça e produção de lã. Na identificação de características determinadas por um único gene, inclui-se o gene da fecundidade *Booroola* (OOV6); o gene da fecundidade *Inverdale* (OOVX); hipertrofia muscular *callipyge* (OOV18), hipertrofia muscular Carwell (OOV18), musculatura dupla Texel Belga (OOV2) ; e síndrome do *spider lam* (OOV6) (Cockett et al., 2001).

O banco de dados da espécie é acessado através de <http://www.thearkdb.org> (Rosalin Institute), ou através de <http://texas.therkdb.org> (Texa A&M University). O SheepBase possui atualmente 1.492 loci, com 369 genes e 1.098 marcadores de microsatélites.

### Fecundidade

A mutação  $FecB^B$  é codominante para taxa de ovulação e parcialmente dominante para tamanho da ninhada, com acréscimo de um a dois cordeiros nascidos por cópia de  $FecB^B$ . Estudos demonstram que células  $FecB^+/FecB^+$  são menos responsivas ao efeito inibitório causado pelo fator de crescimento b (TGF-b) na secreção de progesterona pelas células granulosas. A progesterona é necessária para a maturação dos folículos ovulatórios.

Estudos comparativos localizaram o locus  $FecB^B$  no cromossomo 6 de ovinos, correspondendo a localização 4q21-25 de humanos (Cockett et al., 2001). Após investigação de candidatos posicionais, verificou-se que tal fato está associado à mutação da proteína receptora IB (BMPR-IB), membro da família transformadora do TGF-b. Seus ligantes naturais normalmente inibem a secreção de progesterona, levando a um maior desenvolvimento folicular dos animais portadores da mutação na proteína receptora.

O gene da fecundidade *Inverdale*  $FecX$  foi identificado em uma família de ovelhas prolíferas de Romney na Nova Zelândia. Fêmeas portadoras do  $FecX^1$  possuem um acréscimo de 0,6 cordeiros extras por nascimento, sendo que as fêmeas homocigotas para o alelo são inférteis. O gene  $FecX$  foi localizado numa região de 10 cM no cromossomo X, correspondente à localização Xp11.2-11.4 em humanos, que corresponde à seqüência codificadora do gene de outro membro da superfamília TGF-b, a proteína BMP15. Estudos sugerem que as características de fecundidade ligadas ao cromossomo X, bem como o *Booroola*, são devidos à genes mutados na via IGF-b.

### Hipertrofia muscular

O gene *callipyge* é uma mutação responsável pela hipertrofia pronunciada da musculatura pélvica. Tal característica é ausente ao nascimento e desenvolve-se após a terceira semana de idade. Animais portadores possuem carcaças mais produtivas, com decréscimo da maciez do lombo. A herança é chamada de sobredominante polar, na qual apenas os heterocigotos expressam o fenótipo quando herdado do pai (Freking et al., 1997).

Para caracterizar a região OOV18, dois clones BAC foram seqüenciados completamente e alinhados com as seqüências humanas obtidas no GeneBank. Seis genes foram obtidos neste fragmento, dois dos quais anteriormente reportados em humanos, camundongos e bovinos (Cockett et al., 2001). Através de experimentos com RT-PCR, foi verificado que todos os transcritos são expressos preferencialmente no músculo esquelético. Todos os seis genes sofrem *imprinting*, sendo que três genes são paternalmente expressos (*DLK1*, *DAT* e *PEG11*) e os outros três maternalmente expressos (*GTL2*, *antiPEG11* e *MEG8*). Tal verificação foi realizada através de análise de *SNPs* (*single nucleotide polymorphism*), onde os alelos paterno e materno são diferenciados na forma de mRNA expresso. Contudo, a mutação *clp* não é bem conhecida, sabendo-se apenas que ela atua em *cis* elementos que regulam a expressão e que o aumento de expressão de um ou mais genes leva à manifestação do fenótipo *callipyge*.

Outro gene responsável pela hipertrofia muscular na área de olho de lombo (REM ou Carwell) tem sido reportado, mas seu efeito é menos notável que o gene *callipyge*. O locus REM aparentemente atua de forma dominante, sem evidências de *imprinting*. Estudos revelam que o locus REM e *callipyge* podem ser controlados por dois genes ligados.

Ovinos Texel são possuidores de hipertrofia muscular generalizada. Baseado nas evidências de associação entre mutação do gene da miostatina e musculatura dupla em bovinos, um estudo do possível envolvimento da hipertrofia no Texel com a miostatina foi desenvolvido. Entretanto, não foi obtida diferença nas seqüências do gene miostatina em animais Texel Belga e Romanov (controle). Portanto, a mutação responsável pela hipertrofia muscular do Texel Belga reside em outro segmento que não o gene da miostatina.

## Síndrome do *Spider Lamb*

A condrodisplasia hereditária de ovinos - ou SLS - é uma desordem genética recessiva causadora de deformidades ósseas em cordeiros recém-nascidos. Supõe-se que a origem da desordem foi uma mutação numa linhagem de Suffolk intensivamente usada devido a suas características desejáveis.

O gene foi localizado através de análises de ligação na parte distal do OOV6. O mapeamento comparativo deste gene, levou á localização HSA 4p16.3 do gene humano FGFR3 (receptor do fator de crescimento 3), cuja mutação está associada à várias formas de nanismo (O'Brien et al., 1999). Há suposições que os animais heterozigotos para a mutação tenham um crescimento acima do normal, o que explicaria, em parte, a alta frequência da SLS observada em animais de exposição.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Crawford, A.M.; Dodds, K.G. ; Pierson, C.A. An autosomal genetic linkage map of the sheep genome. **Genetics**, n.140, p.703-724, 1995.
- Cockett, N.E.; Shay, T.L.; Smit, M. Analysis of the sheep genome. **Physiol Genomics**, n. 7, p.69-78, 2001.
- DeGartori, M. J.; Freking, B. A.; Cuthbertson, R. P. Kappes, S.M.; Keele, J. N., Leymaster, K. A.; Dodds, K. G.; Crawford, A. M., Beattie, C.W. A second-generation linkage map of the sheep genome. **Mamm. Genome**, n.9, 204-209, 1998.
- DeLeón, F.A.P.; Ambady, S.; Hawkins, G. A.; Kappes, S. M.; Bishop, M. D.; Robl, J.M., Beattie, C.W. Development of a bovine X chromosome linkage group and painting probes to assess cattle, sheep and goat X chromosome segment homologies. **PNAS**, n. 93, p.3450-3454, 1996.
- Freking, B.A.; Keele, J.W.; Beattie, C.W.; Kappes, S.M.; Smith, T.P.L.; Sonstegard, T.S.; Nielsen, M.K.; Leymaster, K.A. Evaluation of the ovine *Callipyge* locus: I. Relative chromosomal position and gene action. **J.Animal Sci.** n.76, p.2062-2071, 1998.
- Hayes, H.; Petit, E.; Dutrillaux, B. Comparison of RGB-banded karyotypes of cattle, sheep and goats. **Cytogenet Cell Genet**, n.57, p.51-55, 1991.
- Hayes, H. Chromosome painting with human chromosome-specific DNA libraries reveals the extent and distribution of conserved segments in bovine chromosomes. **Cytogenet Cell Genet.**, n.71, p.168-174, 1995.
- Hediger, R.; Ansari, H.A.; Stranzinger, G.F. Chromosome banding and gene localization support extensive conservation of chromosome structure between cattle and sheep. **Cytogenet Cell Genet.**, n.57, p.127-134, 1991.
- La Gioia, D.; Gonçalves, H.C. ; Wechsler, F.S. ; Ramos, P.R.R. Correlação dos alelos da a s1- caseína com o valor genético de caprinos leiteiros. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 35, 1998, Botucatu: SBZ. **Anais...** Ed. Moura, A.S.A.M.T; Wechsler, F.S.; Levezzo, W. 4 vol. p.243-245, 1988a.
- La Gioia, D.; Gonçalves, H.C. ; Wechsler, F.S. ; Ramos, P.R.R. Identificação dos alelos e genótipos da a s1-caseína em caprinos leiteiros. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 35, 1998, Botucatu: SBZ. **Anais...** Moura, A.S.A.M.T; Wechsler, F.S.; Levezzo, W. (eds.) 4 vol. p.246-248, 1988b.
- Maddox, J.F. ; Davies, K.P. ; Crawford, A.M. et al. An enhanced linkage map of the sheep genome comprising more than 1000 loci. **Genome Research**, n.11, p.1275-1298, 2001.
- Moiolo, B.; Pilla, F.; Tripaldi, C. Detection of milk protein polymorphism in order to improve dairy traits in sheep and goats: a review. **Small Ruminant Research**, n.27, 185-195, 1998.
- Schibler, L.; Vaiman, D.; Oustry, A.; Giraud-Delville, C.; Cribiu, E.P. Comparative gene mapping: a fine-scale survey of chromosome rearrangements between ruminants and humans. **Genome Research**, n.8, p.901-915, 1998.
- Schibler, L.; Cribiu, E.P.; Oustry -Vaiman, A, Furet, J.P, Vaiman, D. Fine mapping suggest that the goat *Polled Intersex Syndrome and the human Blepharophimosis Ptosis Epicanthus Syndrome* map to a 100-kb homologous region. **Genome Research**, n.10, p.311-318, 2000.
- Vaiman, D.; Pailhoux, E.; Schibler, L.; Oustry, A.; Chaffaux, S.; Catinot, C.; Felleus, M.; Cribiu, E.P. Genetic mapping of the polled/intersex locus (PIS) in goats. **Theriogenology**, n.47, p.103-109, 1996.
- Vaiman, D.; Schibler, L.; Bourgeois, F.; Oustry, A.; Amigues, Y.; Cribiu, E.P. A genetic linkage map of the male goat genome. **Genetics**, n.144, 279-305, 1996.
- Vaiman, D.; Schibler, L.; Oustry -Vaiman, A; Pailoux, E.; Goldammer, T.; Stevanovic, M.; Furet, J.P.; Schwerin, M.; Catinot, C.; Fellous, M.; Cribiu, E.P. High-resolution Human/Goat comparative map of the goat Polled/Intersex Syndrome (PIS):The Human Homologue is contained in human YAC from HSA3q23. **Genomics**, n.56, p.31-39, 1999.