

FREQUÊNCIA ALÉLICA DO GENE DA AROMATASE (Cyp19) EM OVINOS SANTA INÊS¹

Ana Maria Bezerra Oliveira Lobo^{2a}, Simone Eliza Faccioni Guimarães³, Raimundo Nonato Braga Lobo^{4a}, Samuel Rezende Paiva⁵, Marcos Soares Lopes⁶

¹Pesquisa financiada pelo CNPq

²Aluna do Programa de Pós Graduação em Genética e Melhoramento/Laboratório de Biotecnologia Animal/Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. E-mail: oliveiraana@yahoo.com.br

³Programa de Melhoramento Genético de Caprinos e Ovinos de Corte (GENECOC)

⁴Profa. do Programa de Pós Graduação em Genética e Melhoramento/Laboratório de Biotecnologia Animal/Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. sfacioni@ufv.br

⁵Pesquisador/Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral, CE, Brasil/ Bolsista produtividade CNPq, E-mail: lobo@cnpq.embrapa.br

⁶Pesquisador/Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Brasil. E-mail: samuel@cenargen.embrapa.br

⁶Aluno do Curso de Zootecnia/Laboratório de Biotecnologia Animal/Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. Email: marcosmsl@hotmail.com

Resumo: A identificação e uso de polimorfismos em genes candidatos é uma das estratégias que podem ser usadas em melhoramento atualmente. Desta forma, um total de 279 animais da raça Santa Inês foi genotipado para o polimorfismo T242C no gene da aromatase pela técnica de PCR-RFLP/Reação em Cadeia da Polimerase – Análise de Polimorfismo no Comprimento dos Fragmentos de Restrição. A enzima *DpnII* foi usada como ferramenta diagnóstico para análise do sítio de restrição. Na população analisada, foi confirmada a presença de uma transição T>C no éxon 3, na posição 242 da seqüência AJ012151. A frequência dos genótipos foram: CC – 1,08% (3 animais), TC – 86,02% (240 animais) e TT – 12,90% (36 animais). Estes resultados serão usados para auxiliar a montagem e escolha de reprodutores para futuros experimentos de associação de alelos favoráveis com características quantitativas desejáveis para ovinocultura nacional.

Palavras-chave: citocromo P450, estrogênio, gene candidato, *Ovis aries*

Abstract: PCR-RFLP was used to genotype 279 Santa Inês Sheep for T242C aromatase polymorphism. The enzyme *DpnII* was used as a diagnostic tool for restriction site analysis. A T>C transition was verified within exon 3 at position 242 of sequence AJ012151 (database accession number) according to Vanselow et al. (1999). The genotype frequencies were: CC - 1.08 % (3 animals), TC – 86.02 % (240 animals) and TT – 12.90 % (36 animals). The knowledge of allelic frequencies for this polymorphism will facilitate in the choice of those animals with favorable alleles for the quantitative traits under selection.

Keywords: candidate gene, cytochrome P450, *Ovis aries*, estrogen

Introdução

A enzima aromatase citocromo P450 (P450arom) catalisa a conversão de esteróides C₁₉ (androstenediona, testosterona) a C₁₈ estrógenos (estrone, estradiol), um passo primordial na biossíntese de estrogênios (Thompson & Siiteri, 1974). A P450arom é o produto de um único gene chamado *Cyp19* que pertence à superfamília do citocromo P450 que contém mais de 600 membros pertencentes a 100 famílias das quais a P450arom é o único membro da família 19. O gene *Cyp19* ovino está localizado na região q24-q31 do cromossomo sete e possui um tamanho

de 1546 bp com uma janela aberta de leitura de 1509 bp e um códon de parada da tradução, TAA. A tradução do RNA pode gerar uma proteína de 503 aminoácidos.

O estrogênio é um hormônio de importante atividade endócrina, parácrina e autócrina, envolvido não somente na regulação da reprodução de machos e fêmeas, mas também em outras características como deposição de gordura e crescimento (Zsolnai et al., 2002). Os hormônios estrogênicos, progesterona e estradiol são importantes reguladores da gestação e parto. Diante disso, a enzima aromatase apresenta importante papel no desenvolvimento, função e regulação do ciclo reprodutivo das fêmeas. Portanto, o gene *Cyp19* é considerado um candidato afetando o desempenho reprodutivo e a produção dos animais.

Objetivou-se neste trabalho verificar a presença de polimorfismo do tipo SNP – Single Nucleotide Polymorphism no gene da aromatase e a frequência alélica destas variantes em ovinos da raça Santa Inês como subsídio a futuros programas de associação com características de produção.

Material e Métodos

A amostra analisada consistiu de 279 animais Santa Inês, selecionados do rebanho comercial da Gaasa Agropecuária Ltda, Goiás. A propriedade é associada ao Programa de Melhoramento Genético de Caprinos e Ovinos de Corte (GENECOC) da Embrapa Caprinos e Ovinos. Nesta população 16 animais eram reprodutores, cada um com uma média de filhas (meio-irmãos) de 6,63. A manipulação e subsequente análises do DNA genômico foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia Animal (LABTEC) da Universidade Federal de Viçosa. Primers propostos por Vanselow et al. (1999) foram usados para amplificação da região do gene *Cyp19* contendo o polimorfismo. Foi realizado o resequenciamento da seqüência referência depositada no GenBank (AJ012153) para confirmação do polimorfismo na população analisada. A enzima *DpnII* foi usada como ferramenta diagnóstico para análise de restrição do sítio no qual foi localizado uma substituição de base T>C na posição 242. A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada em termociclador em um volume final de 20 µl por reação. A mistura continha 5 pmol de cada primer, 1,5 unidades de Taq DNA polimerase, 100 µM de cada dNTP, 2,0 mM de MgCl₂, 50 mM Tris-KCl e 25 ng de DNA genômico. O programa de amplificação consistiu de desnaturação a 94°C por 5 min, seguido por 33 ciclos de 94°C por 1 min, 55°C por 1 min, 70°C por 2 min e extensão final à 72°C por 20 min. O produto amplificado foi visualizado em gel de poliácridamida a 8% (w/v) corado com nitrato de prata. O produto de PCR (8,0 µl) foi incubado com a enzima de restrição (5 U *DpnII*; Biolabs) e tampão por 3 h à 37°C. Os fragmentos de restrição foram subsequentemente analisados em gel de poliácridamida a 8%.

Resultados e Discussão

Na população analisada foi confirmada a presença de uma transição T>C no éxon 3, na posição 242 da seqüência AJ012151 (número de acesso GenBank) descrita por Vanselow et al. (1999). O fragmento amplificado do gene *Cyp19* contém 140 bp e o polimorfismo T242C é localizado no códon 69. O alelo T (produto de PCR não digerido) tem um tamanho de 140 bp e o alelo C tem dois fragmentos de 82 bp e 58 bp (Figura 1). A frequência do gene para o alelo T foi 55,91% e para o alelo C foi de 44,09%. A frequência dos genótipos foram: CC – 1,08% (3 animais), TC – 86,02% (240 animais) e TT – 12,90% (36 animais). Lôbo (2008), analisando polimorfismo neste gene em diversas raças de ovinos de corte, verificou que as frequências alélicas foram diferentes entre raças. Vanselow et al. (1999) descreveu herança Mendeliana codominante em duas famílias da raça Merino Húngaro. Lôbo et al. (2009, em prelo) encontraram evidências de associação deste polimorfismo com características de reprodução e habilidade materna em ovinos de corte. Os autores justificaram a possibilidade de que o polimorfismo promova diferenças na atividade da enzima, resultando em diferenças no desempenho dos animais. Zsolnai et al. (2002) descreveram dois polimorfismos no gene *Cyp19*, um localizado no promotor 2 (P2) e o outro no intron 9 (I9). Jedrzejczak et al. (2006) não encontraram associação entre polimorfismo no gene *Cyp19* e produção de leite em bovinos.

Apesar de não afetar a proteína, o polimorfismo T242C pode alterar a estrutura do RNA mensageiro afetando a concentração final da proteína. Há evidências que a redução nos níveis de expressão da aromatase poderá reduzir os níveis de estrógenos.

A associação deste polimorfismo com características de importância econômica em ovinos poderá auxiliar a seleção de características produtivas e reprodutivas em ovinos. O conhecimento das frequências alélicas para este polimorfismo facilitará na escolha daqueles animais com alelos favoráveis para as características quantitativas sob seleção.

Conclusões

O presente trabalho demonstrou a presença de SNP em ovinos Santa Inês, sendo o mesmo considerado um marcador para o gene *Cyp19*. As informações de marcadores diretos verificados neste trabalho poderão ser usadas como ferramenta adicional para seleção de reprodutores para experimentos de associação deste e de outros polimorfismos com características de importância econômica em ovinos de corte.

Literatura citada

Jedrzeiczak, M.; Szatkowska, I.; et al. Evaluation of associations of the polymorphism in the placenta-specific promoter 1.1 of the *Cyp19* gene in Black-and-White and Jersey cattle with milk production traits. **Archiv Tierzucht, Dummerstorf**, v.49, p.311-314, 2006.

Lôbo, A.M.B.O. **Estudo genético de características de importância econômica em uma população multirracial de ovinos de corte: uma abordagem quantitativa e molecular**, 2008. 96f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

Lôbo, A.M.B.O.; Lôbo, R.N.B.; Paiva, S.R (em prelo). Aromatase Gene and Its Effects on Growth, Reproductive and Maternal Ability Traits in a Multibreed Sheep Population from Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, 2009.

Thompson, E.A. Jr & Siiteri, P.K. The involvement of human placental microsomal cytochrome P-450 in aromatization. **Journal of Biological Chemistry**, v.249, p.5373–5378, 1974.

Vanselow, J.; Zsolnai, A.; Fésus, L.; Schimidt, P.; Schwerin, M.A. Bsp143I PCR-RFLP in exon 3 of the ovine aromatase gene (*CYP19*), **Animal Genetics**, v.30, p.382-405, 1999.

Zsolnai, A.; Anton, I.; Fésüs, L.; Estonba A.; Schwerin, M.; Vanselow, J. Allele distributions of two novel SNPs within the sheep *Cyp19* gene, **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v.119, p.402-405, 2002.

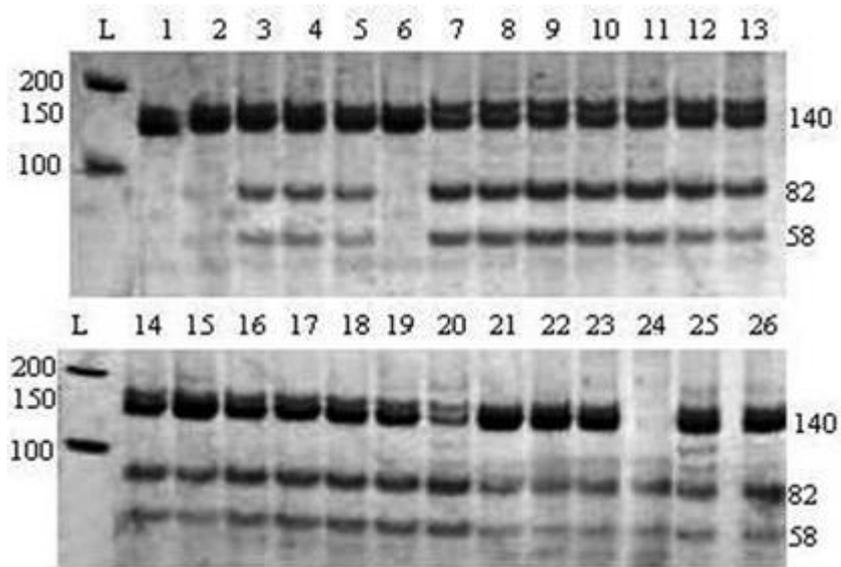


Figura 1. Diagnóstico de fragmentos por PCR-RFLP do gene (*Cyp19*). Produto de PCR não digerido tem 140 pb (alelo T) e, e no caso do alelo C, são dois fragmentos, um de 82 pb e 58 pb. L = Marcador de peso molecular 100pb - Ladder (Promega®). Linha 1, 2 e 6 = TT; Linha 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 25 e 26 = TC; Linha 24 = CC.