

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**POLIMORFISMOS NO GENE JY-1 E SUAS ASSOCIAÇÕES
COM PROBABILIDADE DE PREENHEZ PRECOCE E
CARACTERÍSTICAS DE CRESCIMENTO EM NOVILHAS DA
RAÇA NELORE.**

Gregório Miguel Ferreira de Camargo

Zootecnista

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL

2012

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**POLIMORFISMOS NO GENE JY-1 E SUAS ASSOCIAÇÕES
COM PROBABILIDADE DE PRENHEZ PRECOCE E
CARACTERÍSTICAS DE CRESCIMENTO EM NOVILHAS DA
RAÇA NELORE.**

Gregório Miguel Ferreira de Camargo

Orientador: **Prof. Dr. Humberto Tonhati**

Co-Orientadoras: **Prof^a. Dr^a. Lucia Galvão de Albuquerque**

Dr^a. Luciana Correia de Almeida Regitano

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento Animal.

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

C172p Camargo, Gregório Miguel Ferreira de
Polimorfismos no gene JY-1 e suas associações com probabilidade de prenhez precoce e características de crescimento em novilhas da raça Nelore. / Gregório Miguel Ferreira de Camargo – Jaboticabal, 2012 v, 49f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2012

Orientador: Humberto Tonhati

Banca examinadora: José Fernando Garcia, Simone Cristina Méo

Niciura

Bibliografia

1. *Bos taurus indicus* 2.marcadores moleculares. 3.SNP.
4.sequenciamento. I. Título. II. Jaboticabal - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 636.082:636.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação - Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Campus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: POLIMORFISMOS NO GENE JY-1 E SUAS ASSOCIAÇÕES COM PROBABILIDADE DE PRENHEZ PRECOCE E CARACTERÍSTICAS DE CRESCIMENTO EM NOVILHAS DA RAÇA NELORE

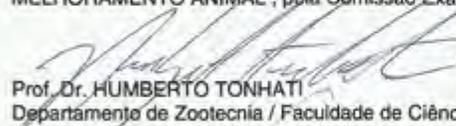
AUTOR: GREGÓRIO MIGUEL FERREIRA DE CAMARGO

ORIENTADOR: Prof. Dr. HUMBERTO TONHATI

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. LUCIANA CORREIA DE ALMEIDA REGITANO

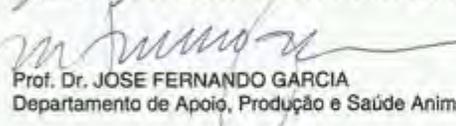
CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. LUCIA GALVAO DE ALBUQUERQUE

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM GENÉTICA E MELHORAMENTO ANIMAL, pela Comissão Examinadora:



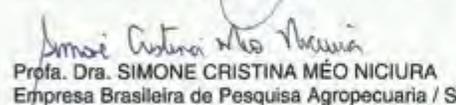
Prof. Dr. HUMBERTO TONHATI

Departamento de Zootecnia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal



Prof. Dr. JOSE FERNANDO GARCIA

Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / Faculdade de Odontologia de Araçatuba



Profa. Dra. SIMONE CRISTINA MÉO NICIURA

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária / São Carlos/SP

Data da realização: 16 de fevereiro de 2012.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

GREGÓRIO MIGUEL FERREIRA DE CAMARGO – solteiro, nascido em 11 de março de 1987, na cidade de Birigui – SP, filho de Gregório Ferreira de Camargo Neto (*in memorian*) e Tânia Pontes Miguel de Camargo. Iniciou em fevereiro de 2005 o curso de graduação em Zootecnia na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus de Jaboticabal obtendo o título de Zootecnista em janeiro de 2010. Durante a graduação, foi bolsista de Iniciação Científica da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo por três anos sob orientação do Prof. Dr. Humberto Tonhati recebendo o prêmio Alltech Young Scientist de segundo lugar no Brasil e terceiro na América Latina na categoria “pesquisa feita por graduandos” no ano de 2009. Na ocasião da colação de grau, recebeu os prêmios de maior média geral e maior média de disciplinas profissionalizantes da turma. Em março de 2010, ingressou no Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus de Jaboticabal como bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo sob orientação do Prof. Dr. Humberto Tonhati, obtendo o título de Mestre em 16 de fevereiro de 2012.

Oferecimento

Ofereço minha dissertação de mestrado à minha família. Minha família é minha razão de viver. Ela me formou como pessoa, deu-me raízes para sempre voltar e asas para voar. À minha mãe Tânia, ao meu pai Gregório (*in memoriam*), à minha irmã Letícia, aos meus avós Dario, Jairo (*in memoriam*), Teresinha e Elza, aos meus tios Toni, Pierina, Silvia, Leonil, Júnior, Fádua e Marqueza e primos Luciana, Carolina, Francisco, Dara e Larissa, meu eterno obrigado por simplesmente tudo.

“Conhecimento existe para ser compartilhado”

José Mindlin (1914-2010), bibliófilo

Agradecimento

Agradeço...

À Deus, por ter me dado força, alegria e oportunidades na minha vida.

Ao professor Humberto Tonhati, pela orientação e amizade que trespasam gerações. Ser seu orientado é sempre muito bom. A sintonia já é tão grande que não consigo mais ser orientado de outra pessoa. Você me ensinou mais que melhoramento genético, me ensinou coisas da vida.

À minha família, pelos momentos de ausência para que pudesse atingir meus ideais e pelos reencontros felizes. Minha felicidade e as minhas realizações também são suas.

À minha família em Jaboticabal: Ana Claudia, Tonhati, João Humberto e Luísa, pelo carinho, atenção e zelo. Obrigado por tudo. Eternamente grato.

Às minhas co-orientadoras professora Lucia e doutora Luciana, pelos ensinamentos, atenção e contribuição. Para mim, é uma honra ser co-orientado de vocês duas.

À Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal pela educação formal e informal. Aos cidadãos paulistas que contribuíram pela minha formação profissional como Zootecnista e Mestre através do pagamento de impostos. Espero poder retribuir os benefícios a mim concedidos para a sociedade.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) pela bolsa de estudos concedida.

À Agropecuária Jacarezinho pela doação do material biológico e disponibilidade dos dados.

Aos meus amigos de laboratório da pós-graduação: Diercles, Fernanda, Patrícia, Camila, Larissa Zetouni, Larissa Fonseca e Marina. Obrigado pela convivência, risadas e ensinamentos.

À Marcela, pela amizade e respeito de sempre.

Aos meus amigos: Marcela, Natália, Mariana Berton, Mariana Casagrande, Gabriela e Taís. Obrigado por estarem em minha vida.

À minha banca de qualificação, professores Tonhati, Marcílio e Henrique e à minha banca de defesa, professores Tonhati e José Fernando e Dra. Simone pelas sugestões e correções.

Aos meus amigos do Departamento de Zootecnia: Fábio, Arione, Raul, Raphael, Denise, Natália, Rodrigo, Naudin, Daniel Santos, Daniele, Dimas, Iara, Francisco, Ana Paula e Daniel Gordo pela convivência tão valiosa.

Ao Fábio, pela constante ajuda. Ao Raul, Arione e Fernando pela ajuda nas análises estatísticas.

Aos meus co-orientados: Válter, Ana Claudia, Ana Carolina e Anna Luiza pela oportunidade de trabalhar e ensinar um pouco a vocês. Eu também aprendi muito.

Aos meus professores que contribuíram para a minha formação. Obrigado pelo exemplo e dedicação.

Aos funcionários da FCAV-Unesp/Jaboticabal pela ajuda principalmente da Seção de Pós-Graduação, Biblioteca e Departamento de Zootecnia.

Aos técnicos do laboratório de Genética Molecular: João e Paulo pela ajuda.

Ao professor Manoel Victor e alunos da turma de Genética da Zootecnia pelo estágio docência e ensinamentos.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1.....	6
Considerações Gerais.....	6
Revisão de Literatura	7
Objetivos.....	15
Referências Bibliográficas	16
CAPÍTULO 2 – POLIMORFISMOS NO GENE JY-1 E SUAS ASSOCIAÇÕES COM PROBABILIDADE DE PREENHEZ PRECOCE E CARACTERÍSTICAS DE CRESCIMENTO EM NOVILHAS DA RAÇA NELORE	21
Introdução	23
Material e Métodos.....	24
Resultados e Discussão	34
Conclusões.....	46
Referências Bibliográficas	47

CAPÍTULO 1.

CONSIDERAÇÕES GERAIS

A produção de bovinos de corte no Brasil caracteriza-se por apresentar diversos sistemas de produção que se estruturam de acordo com a característica da região em que se insere (EUCLIDES FILHO e EUCLIDES, 2010). Todavia, grande parte dos sistemas apresenta uma característica em comum: o uso de pastagens tropicais como forma fundamental de alimentação. FARIA et al (1997) (citado por PEIXOTO, 2010) calcularam que as pastagens representam cerca de 76% da superfície usada na agricultura, sendo, portanto, 20% da área do país.

Esse fato é extremamente importante dentro do contexto produtivo e visionário, pois propicia redução de custos relativos à nutrição e por consequência faz-se uso de animais que melhor digerem essa fibra e que também são adaptados ao clima tropical.

É sob esse aspecto norteador que a produção de carne deve-se fundamentar a fim de garantir sua competitividade. Estudos realizados pela FAO (2008) estimam que em 2050, 50% da produção da agricultura será de origem animal, a fim de atender à demanda da população humana crescente. Assim, a produção de bovinos de corte adquire importância nesse contexto.

Todavia, essa demanda será suprida somente com a adoção de novas tecnologias (GLENN, 2009). Dentre elas, insere-se o melhoramento genético. Tal ferramenta promove ganho que permanece junto ao rebanho pelas gerações.

A definição do sistema produtivo é de fundamental importância para se escolher as características a serem trabalhadas pelo melhoramento genético.

Os programas de melhoramento genético de bovinos de corte no Brasil contribuíram para um aumento expressivo dos valores das características de crescimento. Entretanto, para características reprodutivas os avanços não se apresentaram no mesmo ritmo (ELER et al. 2010), por isso elas têm recebido particular atenção na composição dos índices de seleção atualmente, principalmente porque apresentam alto valor econômico associado, promovendo maior rentabilidade do sistema.

A probabilidade de prenhez precoce, como medida direta da fêmea, possui alto valor econômico associado (BRUMATTI et al., 2011) e altos valores de herdabilidade que possibilitam ganho genético por seleção (SHIOTSUKI et al., 2009 e BOLIGON e ALBUQUERQUE et al., 2011), porém os ganhos genéticos obtidos para essa característica advêm de seleção indireta para perímetro escrotal (ELER et al., 2010). O progresso genético pode ser maior se for utilizado como critério de seleção a característica medida diretamente na fêmea.

Se a seleção for assistida por marcadores moleculares, o ganho genético pode ser ainda maior, pois eles auxiliam na escolha dos reprodutores. Além disso, a avaliação acontece de forma antecipada, sem necessidade de mensuração das características na progênie (FERRAZ e ELER, 2010). Particularmente, em estudos genômicos de características de limiar, marcadores moleculares auxiliam na avaliação da característica devido à difícil ponderação dos modelos a serem utilizados (FORTES et al., 2010).

REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A importância das características reprodutivas na bovinocultura de corte

2.1.1. Importância econômica

Características reprodutivas participam de forma significativa da rentabilidade do sistema de produção. Devem, portanto, estar presente como critério em índices de seleção. Tal fato, em conjunção com manejos alimentar e reprodutivo adequados, confere a eficiência e plasticidade necessárias para otimização da produção.

As características reprodutivas são extremamente importantes, pois possuem alto valor econômico frente a outras características analisadas em um programa de melhoramento de bovinos de corte (PHOCAS et al., 1998; BRUMATTI et al., 2011). BRUMATTI et al. (2011) concluíram que características reprodutivas como habilidade

de permanência e probabilidade de prenhez precoce são de quatro a treze vezes mais importantes economicamente que características de crescimento.

Expor novilhas precocemente não traz prejuízos reprodutivos futuros desde que o manejo nutricional, sanitário e reprodutivo sejam adequados para a adoção de tal prática. Estudos verificaram que se a primeira prenhez acontecer aos 14 meses, ao invés dos 24 meses, os custos de produção diminuem (FORMIGONI et al. 2005 e MONSALVES, 2008). Os custos variáveis, principalmente relacionados à nutrição, aumentarão, entretanto, o custo capital de formação da matriz será reduzido, pois ela entrará um ano antes em reprodução e dará, pelo menos, um bezerro a mais.

MONSALVES (2008) estudou o valor econômico para a probabilidade de prenhez em três situações distintas: novilhas prenhes aos 14, 18 e 24 meses. Encontrou que quanto mais jovem a novilha ficava prenhe, mais compensador era em termos financeiros. Portanto, o manejo de estação de monta para novilhas precoces é interessante de ser avaliado como estratégia a ser adotada por aqueles que visam maior produtividade e rentabilidade.

MONSALVES (2008) avaliou também que a taxa de prenhez de novilhas é uma característica de valor econômico considerável e que poderia ser incluída nos objetivos de seleção. ELER et al (2010) citam que a redução do primeiro parto de três para dois anos produziria um aumento de 16% no retorno econômico do sistema.

Outro fator importante sobre a probabilidade de prenhez precoce é que VAN MELIS et al. (2010) encontraram correlação genética dessa característica com longevidade da vaca no rebanho de 0,82 para bovinos da raça Nelore. Ou seja, ao se selecionar para precocidade sexual, também se seleciona para longevidade. Há, portanto, maior redução de custos, pois além de a fêmea iniciar sua vida produtiva antes, ela a encerra depois.

2.1.2. Probabilidade de prenhez precoce

A probabilidade de prenhez precoce é uma característica de cada vez maior importância para a bovinocultura de corte. Além de ser uma característica simples, sem

custos adicionais para o sistema de produção e ser de fácil compreensão para o produtor (ELER et al., 2010), ela apresenta resultados econômicos que a justificam como de relevante importância para a cadeia produtiva.

ELER et al (2010) ratificam que a característica é importante de ser melhorada nos rebanhos mesmo que o produtor não exponha suas novilhas precocemente, pois se há seleção para a característica, as fêmeas concebem mais cedo na estação de monta tradicional, assim a estação de parição também acontece mais cedo e pode vir a ser mais curta. Dessa maneira, a probabilidade de concepção na estação subsequente é aumentada, pois o intervalo entre as estações é um pouco maior.

ELER et al., (2004) e VAN MELIS et al. (2010) citam bons resultados encontrados com a avaliação da característica probabilidade de prenhez aos 14 meses em novilhas Nelore. Foram encontrados valores de herdabilidade de 0,57 e 0,54, pelos autores respectivamente, indicando grande variabilidade genética e possibilidade de seleção. Altos valores de herdabilidade também foram reportados para probabilidade de prenhez precoce aos 16 meses variando de 0,45 a 0,49 (SILVA et al, 2005, SHIOTSUKI et al., 2009, BOLIGON e ALBUQUERQUE, 2011 e TERAKADO, 2011).

Sendo assim, há a possibilidade de ganho genético para a característica mencionada quando a mesma estiver sob seleção direta, sendo os ganhos maiores do que os adquiridos por seleção indireta para perímetro escrotal como feito outrora (VAN MELIS et al 2010 e TERAKADO, 2011).

A correlação genética da precocidade sexual com características de crescimento e escores visuais foi estudada por SHIOTSUKI et al., (2009), a fim de verificar se a seleção para uma pode influenciar a outra e vice-versa. Seleção para prenhez aos 16 meses resulta em animais com menor altura. Todavia, a seleção para crescimento e escores visuais de terminação e musculatura afeta muito pouco ou não afeta a probabilidade de prenhez aos 16 meses. BOLIGON e ALBUQUERQUE (2011) mostraram que probabilidade de prenhez aos 16 meses tem correlação moderada com ganho pré-desmama e peso ao sobreano, indicando que seleção de longo prazo para animais mais pesados em idades jovens contribui para novilhas mais precoces

sexualmente. Mostraram ainda que a seleção para probabilidade de prenhez aos 16 meses afeta pouco o peso da vaca à maturidade, pois a correlação genética é baixa.

2.2. Marcadores moleculares para características reprodutivas

MEUWISSEN et al. (2001) em seu trabalho pioneiro concluiu que a seleção genômica pode aumentar o ganho genético especialmente se combinadas com técnicas reprodutivas para diminuir o intervalo de gerações. Marcadores moleculares podem auxiliar e complementar esse processo.

MILAZZOTTO et al. (2008) estudaram, em 100 fêmeas Nelore, parcialmente, o éxon 10 do gene receptor do hormônio LH (LHR), parcialmente, o éxon 11 do gene receptor do hormônio FSH (FSHR) e os éxons 1, 2 e 3 do gene receptor do hormônio GnRH (GnRHR). Foram encontrados dezenove SNPs, sendo que, em oito deles existia substituição aminoacídica. Três SNPs localizados no FSHR foram correlacionados com precocidade sexual. Esse fato mostra que existe grande variação de nucleotídeos nos genes dos hormônios diretamente ligados à reprodução e que a busca por associações entre essa variabilidade e as características reprodutivas em bovinos da raça Nelore é plausível.

MARSON et al. (2008) estudaram seis dos SNPs identificados por MILAZZOTTO et al. (2008) para os genes LHR e FSHR em 370 novilhas de diferentes composições raciais zebu-auricular e avaliaram a precocidade sexual por meio da probabilidade de prenhez. Apesar de as novilhas heterozigotas terem apresentado melhores índices de concepção, nenhuma correlação foi estabelecida entre os SNPs e a característica analisada.

HASTINGS et al. (2006), estudando três SNPs no éxon 11 no gene do LHR em bovinos da raça Holandesa, observaram correlação deles com intervalo de partos, número de dias para o primeiro serviço e um índice econômico de produção do Reino Unido.

Marcadores moleculares de genes que não correlacionados diretamente com o eixo hipotálamo-hipófise podem também estar associados com características

reprodutivas devido à associação metabólica que possuem. GRUPIONI et al. (2009) em bovinos da raça Canchim, verificaram efeito significativo do gene do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 na idade ao primeiro parto (IPP) e GROSSI et al. (2009) em estudo com a mesma população, verificaram efeito de substituição alélica do mesmo gene para as características IPP e peso ao primeiro parto (PPP).

CLEMPSON et al. (2011a, b) estudaram polimorfismos para genes moderadores da energia da mitocôndria (TFAM e UCP2) e para o gene da leptina (modulador de ingestão alimentar) em bovinos leiteiros e encontraram associação significativa com características reprodutivas em novilhas e vacas. Em novilhas, polimorfismos no gene UCP2 estão correlacionadas com idade ao primeiro parto e início da atividade luteal e no gene da leptina, com idade ao primeiro serviço, número de serviços por concepção, número total de serviços e idade ao primeiro parto. Em vacas, polimorfismos no TFAM foram correlacionados com número de serviço por concepção, dias para a concepção e porcentagem de concepção e no gene da leptina com início da atividade luteal.

Esse é um indicativo de que a reprodução em bovinos leiteiros está intimamente ligada ao balanço energético e alimentar. Assim, genes que atuam frente a essas ações metabólicas podem ser usados para melhor entender características reprodutivas e aumentar o ganho genético das mesmas. Além do que, podem ser extrapolados para estudos em bovinos de corte em situações similares (características envolvidas com balanço energético e alimentar) como é o caso da probabilidade de prenhez precoce.

2.3. A proteína JY-1

A proteína JY-1 foi descrita por BETTEGOWDA et al. (2007) e é específica do oócito, possuindo importante papel regulador na camada de células da granulosa e no início do desenvolvimento do embrião. Foi a primeira vez que uma proteína específica de origem materna para uma espécie de ovulação simples, ou seja, de fêmeas uníparas (que em geral, tem um produto por prenhez) foi descrita. A espécie utilizada no estudo foi a bovina. Outros genes específicos de proteínas para espécies com ovulação múltipla e que atuam na foliculogênese e no desenvolvimento inicial do embrião já

foram descritos em espécies multíparas como ratos de laboratório, mas diversos estudos indicam que esses genes para proteínas que atuam especificamente no oócito sejam diferentes para espécies multíparas e uníparas (GALLOWAY et al. 2000; GALLOWAY et al., 2002; HANRAHAN et al., 2004; MOORE et al., 2004). Isso reforça a existência de genes específicos que atuam na reprodução de multíparas e uníparas, evidenciando a importância da descoberta da proteína (BETTEGOWDA et al., 2007)

BETTEGOWDA et al. (2007) coletaram mRNA de ovários fetais entre 180 e 210 dias de prenhez e através da técnica de RT-PCR, obtiveram-se o cDNA corresponde a partir do qual definiu-se a sequência de aminoácidos da proteína JY-1. Amostras de mRNA também foram coletadas de oócitos em estado de vesículas germinativas de ovários adultos nos quais se constatou a presença do mRNA da proteína JY-1. As sequências das diferentes bibliotecas de cDNA obtidas possuem o número de acesso EF642496 e EF642497 no GenBank.

A proteína JY-1 tem peso molecular de aproximadamente 9000 Mr e dois sítios de glicosilação. Não possui proteínas ortólogas por comparação da sequência dos aminoácidos e domínios funcionais. Portanto, trata-se de membro de uma nova família de proteínas (BETTEGOWDA et al., 2007).

Hibridizações *in situ* localizaram o mRNA da JY-1 no interior dos oócitos, especificamente nos folículos pré-antrais e antrais. A proteína JY-1 foi localizada em oócitos de folículos em crescimento nas fases primordial, primária até folículos antrais de ovários fetais aos 230 dias de prenhez (BETTEGOWDA et al., 2007).

2.3.1. A proteína JY-1 e sua influência nos hormônios da reprodução

Uma proteína JY-1 recombinante (rJY-1) foi usada para testar a habilidade dessa em regular a proliferação de células da granulosa e produção de esteroides. A adição de rJY-1 em células da granulosa em meio de cultura inibiu a ação do hormônio FSH bem como a produção de estradiol. Todavia, a adição de rJY-1 causou aumento na produção de progesterona de maneira dose-dependente (BETTEGOWDA et al., 2007).

BETTEGOWDA et al. (2007) concluíram que os resultados da proteína recombinante JY-1 no fenótipo das células da granulosa é uma maneira de mimetizar eventos pré-ovulatórios do processo de luteinização. *In vivo*, o LH faz decrescer os níveis de estradiol, e aumenta os níveis de progesterona no fluido folicular de folículos pré-ovulatórios bovinos (LI et al., 2007) e a transformação de células da granulosa em células luteíticas capazes de produzir altos níveis de progesterona (QUIRK et al., 2004). No experimento descrito *in vitro*, ocorreu aumento na produção de progesterona, supressão de FSH e aumento no número de células de granulosa, sugerindo que a proteína JY-1 pode facilitar a luteinização das células da granulosa, estabelecendo uma co-ação com o hormônio LH.

2.3.2. Efeito da proteína JY-1 no desenvolvimento embrionário

Os resultados obtidos por BETTEGOWDA et al. (2007) relatam um importante papel da proteína JY-1 no início do desenvolvimento embrionário de bovinos, tendo WEE et al. (2010) comprovado que a proteína JY-1 atua na regulação de genes ligados à expansão das células do cumulus.

. O mRNA da proteína JY-1 é dinamicamente regulado desde a janela de maturação meiótica até a ativação do genoma do embrião. Experimentos *in vitro* indicam um requerimento da proteína JY-1 no desenvolvimento do estágio de blastocisto em bovinos.

BETTEGOWDA et al. (2007) também observaram que o mRNA da proteína JY-1 de origem materna é traduzido em bovinos durante o início do desenvolvimento embrionário e que possui papel importante durante na manutenção do embrião, pois, segundo os autores, o genoma do embrião de ruminantes domésticos só é ativado no estágio de 8 a 16 células, então genes maternos podem ser requeridos para promover o desenvolvimento do embrião nos primeiros estágios de desenvolvimento. Apesar de a expressão dos genes MATER e ZAR1 terem sido reportadas em oócitos e embriões bovinos, faltam evidências experimentais da ação deles no início da formação do embrião. Assim a proteína JY-1 é o único fator materno específico do oócito que

comprovadamente atua no início da embriologia de espécies uníparas (PENNETIER et al., 2004 ; 2006).

2.3.3. O gene da proteína JY-1

Segundo BETTEGOWDA et al., (2007), o gene da proteína JY-1 nos bovinos possui três éxons cujos comprimentos são 25 pb, 92 pb e 1400 pb respectivamente indicando o primeiro, o segundo e o terceiro éxons. Eles são separados por dois íntrons cujos comprimentos são 12,8 kb e 1,5 kb (Figura 1). O gene está localizado no cromossomo 29 na espécie bovina.

A Figura 1 é um esquema representativo do gene JY-1 não proporcional ao real tamanho. Os traços indicam os íntrons, as caixas representam os éxons sendo as partes pretas, as regiões codificantes.



Figura 1. Esquema representativo do gene JY-1. Os traços indicam os íntrons, as caixas representam os éxons sendo as partes pretas, as regiões codificantes.

A identificação de sequências parecidas com as que correspondem a uma pequena porção da região 3'UTR do cDNA do JY-1 foi detectada em humanos, chimpanzés, ratos, ratazanas e caninos (ITOH et al., 2005; BAND et al., 2000; CHENG et al., 2005; KIRKNESS et al., 2003). Isso aumenta a possibilidade que o *locus* do gene JY-1 seja conservado entre várias espécies de vertebrados. A sequência identificada da EST de humanos é de células precursoras dos eritroides sugerindo que os mRNA podem ser transcritos desse *locus*. No entanto, a sequência correspondente em humanos não apresenta as regiões correspondem aos éxons 1 e 2 que são importantes regiões para formação da proteína, pois no éxon 2 há parte da região codificante.

Assim, assim o *locus* pode estar conservado, mas a proteína não é expressa (BETTEGOWDA et al.,2007).

OBJETIVOS GERAIS

Características reprodutivas têm se tornado cada vez mais importantes dentro dos índices de seleção devido ao alto valor econômico associado a elas. A probabilidade de prenhez precoce é uma característica com altos valores de herdabilidade e possibilita ganho genético por seleção. Entretanto, é uma característica de limiar e suposições são feitas a fim de analisá-la. Além disso, há dificuldade em se ponderar modelos para características binárias na era da seleção genômica. Por isso, marcadores moleculares em genes candidatos podem auxiliar na avaliação de reprodutores e facilitar o entendimento da característica.

Por isso, no presente projeto, propõe-se verificar a existência de polimorfismos no gene JY-1 que codifica uma proteína específica do oócito de bovinos. Essa proteína atua em co-ação com hormônio luteinizante (LH) nas células da granulosa e influencia no início do desenvolvimento embrionário. Considerando que polimorfismos desse gene nunca foram detectados e associados com características reprodutivas, objetiva-se assim, verificar se há variabilidade para regiões do presente *locus* e correlacionar os possíveis polimorfismos com probabilidade de prenhez precoce e características de crescimento em novilhas da raça Nelore.

REFERÊNCIAS

BAND, M. R. et al. An Ordered Comparative Map of the Cattle and Human Genomes. **Genome Research**, v.10, p.1359–1368, 2000.

BETTEGOWDA, A. et al. JY-1, an oocyte-specific gene, regulates granulosa cell function and early embryonic development in cattle **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.104, p. 17602-17607, 2007.

BOLIGON, A. A.; ALBUQUERQUE, L.G. Genetic parameters and relationships of heifer pregnancy and age at first calving with weight gain, yearling and mature weight in Nelore cattle. **Livestock Science**, v.141, p.12–16, 2011.

BRUMATTI, R. C. FERRAZ, R. C., ELER, J. P. Desenvolvimento de índices de seleção em gado de corte sob enfoque de um modelo bioeconômico. **Archivos de Zootecnia**, v.60, p. 205-213, 2011.

CHENG, Z. et al. A genome-wide comparison of recent chimpanzee and human segmental duplications. **Nature**, v.437, p.88–93, 2005.

CLEMPSON, A. M. et al Polymorphisms in the autosomal genes for mitochondrial function TFAM and UCP2 are associated with performance and longevity in dairy cows. **Animal**, p.1-9, 2011a

CLEMPSON, A. M. et al Evidence that leptin genotype is associated with fertility, growth, and milk production in Holstein cows. **Journal Dairy Science**, v.94, p.3618–3628, 2011b.

ELER, J. P. et al. Additive genetic relationships between heifer pregnancy and scrotal circumference in Nelore cattle. **Journal of Animal Science**, 82, p. 2519–2527, 2004.

ELER, J. P.; FERRAZ, J. B. S.; TEIXEIRA, L. D. Seleção para precocidade sexual em novilhas de corte. In: PIRES, V. A. **Bovinocultura de corte**. Piracicaba: FEALQ, 2010.

EUCLIDES FILHO, K., EUCLIDES, V. P. B. Desenvolvimento recente da pecuária de corte brasileira e suas perspectivas. In: PIRES, V. A. **Bovinocultura de corte**. Piracicaba: FEALQ, 2010.

FAO. Food Agriculture Organization. The Global Livestock Sector – a Growth Engine, 2008 Disponível em: <www.fao.org/ag/AGA> Acesso em 01 nov 2011.

FERRAZ, J. B. S., ELER, J. P. Melhoramento genético para aumento de produtividade em gado de corte no Brasil: A história, o presente e o futuro. In: PIRES, V. A. **Bovinocultura de corte**. Piracicaba: FEALQ, 2010.

FORMIGONI, I.B. et al Economic importance of stayability and heifer pregnancy in cow-calf production systems in Brazil: A bioeconomic simulation. In: **WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION**, 8, 2006, Belo Horizonte. Anais...

GALLOWAY, S.M.; GREGAN, S.M.; WILSON, T. Bmp15 mutations and ovarian function **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.191, p. 15–18, 2002.

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**, v.25, p. 279–283, 2000.

GLENN, B. What Will Animal Agriculture Look Like in 2030? **The Future of Animal Agriculture: 2030**. United States Department of Agriculture, 2009

GROSSI, D. A. et al. Efeito de substituição alélica dos marcadores genéticos de IGF1, GH E PIT1 sobre a idade e o peso ao primeiro parto de bovinos da raça Canchim. In: **REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA**, 46, 2009, Maringá. Anais...

GRUPIONI, N. V. et al. Efeitos dos marcadores genéticos IGF1, GH E PIT1 sobre os valores genéticos da idade ao primeiro parto e peso ao primeiro parto em bovinos da raça Canchim. In: **REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA**, 46, 2009, Maringá. Anais...

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**, v.70, p. 900–909, 2004.

HASTINGS, N. et al Polymorphisms within the coding region of the bovine luteinizing hormone receptor gene and their association with fertility traits. **Animal Genetics**, v.37, p. 583–585, 2006.

ITOH, T. et al A comprehensive radiation hybrid map of the bovine genome comprising 5593 *loci*. **Genomics**, v.85, p.413–424, 2005.

KIRKNESS, E.F. et al. The Dog Genome: Survey Sequencing and Comparative Analysis. **Science**, v.301, p.1898–1903, 2003.

LI, Q. et al Evidence that the preovulatory rise in intrafollicular progesterone may not be required for ovulation in cattle. **Journal of Endocrinology**, v.192, p. 473–483, 2007.

MARSON, E. P. et al Effects of polymorphisms of LHR and FSHR genes on sexual precocity in a *Bos taurus* x *Bos indicus* beef composite population. **Genetics and Molecular Research**, v.7, n.1, p. 243-251, 2008.

MEUWISSEN, T. H. E. et al Prediction of Total Genetic Value Using Genome-Wide Dense Marker Maps. **Genetics**, v. 157, p.1819–1829, 2001.

MILAZZOTTO, M. P. et al New molecular variants of hypothalamus–pituitary–gonad axis genes and their association with early puberty phenotype in *Bos taurus indicus* (Nelore). **Livestock Science**, v.114, p. 274–279, 2008.

MONSALVES, F. M. **Valor econômico e impacto da seleção para precocidade reprodutiva de fêmeas na raça Nelore**. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, FCAV, 2008.

MOORE, R.K.; ERICKSON, G.F.; SHIMASAKI, S. Are BMP-15 and GDF-9 primary determinants of ovulation quota in mammals? **Trends Endocrinology and Metabolism**, v.15, p. 356–361, 2004.

PEIXOTO, A. M. Evolução histórica da pecuária de corte no Brasil. In: PIRES, A.V. Bovinocultura de corte, Piracicaba: FEALQ, 2010

PENNETIER, S. et al MATER protein expression and intracellular localization throughout folliculogenesis and preimplantation embryo development in the bovine **BMC Developmental Biology**, v.6, p. 26, 2006.

PENNETIER, S et al Spatio-Temporal Expression of the Germ Cell Marker Genes MATER, ZAR1, GDF9, BMP15, and VASA in Adult Bovine Tissues, Oocytes, and Preimplantation Embryos **Biology of Reproduction**,. v.71, p.1359–1366, 2004.

PHOCAS, F. et al Developing a breeding objective for a French purebred beef cattle selection programme **Livestock Production Science**, v.57, p. 49-65, 1998

QUIRK, S.M. et al The susceptibility of granulosa cells to apoptosis is influenced by oestradiol and the cell cycle **Journal of Animal Science**, v.82, p. E40–E52, 2004.

SHIOTSUKI, L.; SILVA, J. A. II V; TONHATI, H. et al Genetic associations of sexual precocity with growth traits and visual scores of conformation, finishing, and muscling in Nelore cattle. **Journal of Animal Science**, v.87, p.1591-1597, 2009.

SILVA, J. A. II V.; DIAS, L. T.; ALBUQUERQUE, L. G. Estudo genético da precocidade sexual de novilhas em um rebanho Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.5, p.1568-1572. 2005.

TERAKADO, A. P. N. **Associações genéticas entre perímetro escrotal e características reprodutivas de fêmeas da raça Nelore**. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, FCAV, 2011.

VAN MELIS, M. H.; OLIVEIRA, H. N.; ELER, J. P. et al. Additive genetic relationship of longevity with fertility and production traits in Nellore cattle based on bivariate models **Genetics and Molecular Research**, v.9, p.176-187, 2010.

CAPÍTULO 2. POLIMORFISMOS NO GENE JY-1 E SUAS ASSOCIAÇÕES COM PROBABILIDADE DE PREENHEZ PRECOCE E CARACTERÍSTICAS DE CRESCIMENTO EM NOVILHAS DA RAÇA NELORE.

RESUMO - Na bovinocultura de corte, a probabilidade de prenhez precoce é uma característica de grande relevância devido ao alto valor econômico associado. Essa característica apresenta elevados valores de herdabilidade e há possibilidade de ganho genético por seleção. Todavia, a característica é de limiar com distribuição binária e suposições são feitas no intuito de analisá-la. Marcadores moleculares podem vir a auxiliar na avaliação genética desses animais, além de promover diminuição do intervalo de gerações. A proteína JY-1 é uma proteína específica dos oócitos de bovinos e que atua nas células da granulosa em co-ação com o LH e no desenvolvimento embrionário inicial podendo influenciar a chance de prenhez. Marcadores moleculares foram usados para estudar o gene JY-1 e foram encontrados sete polimorfismos do tipo SNP no éxon 3. As posições dos SNPs no referido éxon e as substituições são: 163 (T/C), 281(T/C), 321(T/C), 532(T/C), 652 (A/G), 679(T/C) e 722 (G/C) (Genbank: JN592587 JF262042.2). O SNP 163 está em região codificante e causa substituição de uma prolina por uma leucina. Os demais SNPs estão em região 3'UTR. Os SNPs 163, 281, 321 e 679 foram genotipados em 297 novilhas da raça Nelore. Os SNPs 163, 321 e 679 estavam em desequilíbrio de ligação entre si e em equilíbrio com o 281. Os genótipos não apresentaram correlação com probabilidade de prenhez precoce e características de crescimento ($P < 0,05$).

Palavras-chave: *Bos taurus indicus*, marcadores moleculares, SNP, sequenciamento

CHAPTER 2. POLYMORPHISMS IN JY-1 GENE AND THEIR ASSOCIATIONS WITH SEXUAL PRECOCITY AND GROWTH TRAITS IN NELLORE HEIFERS.

ABSTRACT - In beef cattle production, the sexual precocity is important because of the high associated economic value. The heritability values are high which permits genetic gain by selection. However, it is a threshold trait with binary distribution and suppositions are done in order to analyze it. So, molecular markers may auxiliary the genetic evaluation of these animals and reduce the generation interval. The JY-1 protein is an oocyte specific cattle protein and acts in granulose cells with LH and also in early embryo development and may influence sexual precocity. The gene of the protein was analyzed by molecular markers and seven SNP polymorphisms were found in exon 3. The SNPs positions in the exon and the substitutions were: 163 (T/C), 281(T/C), 321(T/C), 532(T/C), 652 (A/G), 679(T/C) e 722 (G/C) (Genbank: JN592587 JF262042.2) The SNP 163 is in CDS region and it causes a substitution of a prolin by a leucin. The others SNPs are in 3'UTR region. The SNPs 163, 281, 321 and 679 were genotyped in 297 Nellore heifers. The SNPs 163, 321 and 679 were in linkage disequilibrium among them and the SNP 281 was in equilibrium. The genotypes did not show correlation with sexual precocity and growth traits ($P < 0.05$).

Keywords: *Bos taurus indicus*, molecular markers, SNP, sequencing

INTRODUÇÃO

Dentre as características reprodutivas, a precocidade sexual das fêmeas possui grande importância econômica para a produção (BRUMATTI et al., 2011). Os coeficientes de herdabilidade são altos para probabilidade de prenhez aos 14 e 16 meses, variando de 0,45 a 0,57 (ELER et al., 2004; SILVA et al, 2005; SHIOTSUKI et al., 2009; VAN MELIS et al. 2010; BOLIGON e ALBUQUERQUE, 2011; TERAKADO, 2011).

Esses altos valores sugerem: ausência de seleção e possibilidade de ganho genético. Alguns touros têm 55% das filhas concebendo precocemente, enquanto outros 1% a 2%. Quando, avalia-se a prenhez aos 24 meses, mascara-se a puberdade, pois todas as novilhas já iniciaram a reprodução (ELER et al., 2010).

A probabilidade de prenhez precoce é séria candidata a inclusão como objetivo de seleção, pois a característica tem correlação moderada com crescimento (a seleção para peso à idade jovem contribui para a precocidade) (BOLIGON e ALBUQUERQUE, 2011), possui alta correlação genética com longevidade (VAN MELIS et al., 2010). Segundo BRUMATTI et al. (2011), em estudo genético-econômico, classificaram a precocidade e a habilidade de permanência como características de quatro a treze vezes mais importantes que as de crescimento. Portanto, a seleção para essas características contribui de maneira significativa para a rentabilidade do sistema produtivo. As fêmeas iniciam reprodução antes e terminam depois, gerando mais produtos durante sua vida produtiva e reduzindo o custo capital de formação de matrizes.

A definição geral da característica é bastante simples, dado que todas as novilhas tiveram oportunidade de conceber é atribuído 1 (sucesso) para as que conceberam e 0 (fracasso) para as que falharam. Assim, com essa característica, não existe necessidade do uso de penalidades para as fêmeas que não emprenharam, já que todas são naturalmente incluídas nas análises.

Em se tratando de estudos genômicos, FORTES et al (2010) refletem e discutem que é comum a análise de uma característica quantitativa usando uma medida

fenotípica binária, porém isso é limitante em certos aspectos. Os autores relatam que é difícil encontrar a ponderação correta usando um modelo mais conservador (que fornece poucas associações de SNPs, porém extremamente significativas) ou menos conservador (fornecendo muitas associações de SNPs, mas potencialmente falsas). Além disso, quando se aumenta a população estudada e a densidade dos chips em análises genômicas, as associações são de menor efeito (MACKAY et al, 2009). Assim, os marcadores genético-moleculares podem ser uma ferramenta auxiliar no estudo da característica, indicando pontualmente a fonte de variabilidade e, dessa forma, ajudando a entendê-la.

Assim, escolheu-se para estudo o gene JY-1 que codifica uma proteína específica do oócito, que possui importante papel regulador na camada de células da granulosa em eventos pré-ovulatórios do processo da luteinização desde a janela de maturação meiotica até a ativação do genoma do embrião. Objetivou-se encontrar polimorfismos no gene candidato e estabelecer suas associações com a probabilidade de prenhez precoce e características de crescimento em novilhas Nelore, a fim de verificar a possível inclusão em avaliação de reprodutores e aumentar ganho genético.

MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Animais

As novilhas da raça Nelore usadas nesse estudo pertencem ao programa de melhoramento genético da Agropecuária Jacarezinho em Cotegipe-BA. A empresa é especializada criação e avaliação de bovinos de corte sob sistema de pastagens com o objetivo de venda de tourinhos e animais para o abate.

São feitas duas estações de monta, uma antecipada que ocorre de fevereiro a março em que todas as novilhas são expostas à reprodução por volta dos 16 meses de idade, na tentativa de identificar animais precoces. A outra ocorre de novembro a janeiro, as fêmeas que não conceberam na primeira estação são expostas novamente

(agora com 24 meses) junto com as demais vacas do rebanho. Novilhas que não conceberam na segunda estação de monta são descartadas. Segundo BOLIGON e ALBUQUERQUE (2011), que estudaram o mesmo rebanho, a taxa de prenhez aos 16 meses está por volta de 14%.

2.2. Coleta de material biológico

Foram coletados folículos pilosos de 297 novilhas, sendo que 148 animais conceberam aos 16 meses e 149 não conceberam. Todas nascidas em 2008 filhas de 57 touros. As amostras foram colocadas em envelopes, identificadas e armazenadas a 4 °C até a extração de DNA.

2.3. Análises laboratoriais

As análises laboratoriais foram executadas no Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp / Jaboticabal – SP.

2.3.1. Extração de DNA

As extrações de DNA das amostras de pêlo coletadas foram realizadas a partir da metodologia descrita por LIMA (2003). Cerca de 40 folículos/animal foram depositados em um tubo de microcentrífuga (1,5 mL) e centrifugados rapidamente. Em seguida, adicionaram-se 500 µL de solução TE-Tween (Tris 50 mM, EDTA 1 mM, 0,5% Tween 20) em cada amostra, seguindo à incubação no banho a 65°C por 1,5 horas, com agitação periódica; após esse período, adicionou-se 2 µL de proteinase K/tubo (600 µg/µL) e incubou-se a 55 °C por 6 horas, com agitação periódica; e em seguida incubou-se a 37 °C por uma noite.

Após esses procedimentos, adicionou-se 1 volume de PCI (Fenol-Clorofórmio-Álcool isoamílico) para 1 volume de amostra, agitou-se vigorosamente os tubos por 10

segundos em agitador automático. Posteriormente, centrifugou-se por 10 minutos a 12000 rpm a 23 °C e o sobrenadante foi transferido para novo tubo.

O volume final dessa fase foi de aproximadamente 300 µL. Em seguida foi feita a precipitação do DNA com 1/10 do volume da amostra de acetato de sódio 0,3 M (aproximadamente 30 µL) e etanol absoluto gelado (aproximadamente 1 mL). Após misturar por inversão, os tubos foram colocados no freezer – 80 °C por 1 hora. Prosseguiu-se com centrifugação a 4 °C por 25 minutos a 12000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o DNA remanescente foi completamente seco em temperatura ambiente, e em seguida armazenado em 100 µL de TE (10:1).

2.3.2. Verificação de quantidade e qualidade do DNA obtido

A verificação de quantidade e qualidade do material obtido foi feita com uso do aparelho do espectrofotômetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, EUA, 2008). A quantificação baseada na absorvância advém do fato de o DNA possuir pico de absorvância de luz no comprimento de 260 nm. Assim, a concentração é medida pela relação $1 \text{ OD}_{260} = 50 \text{ µg/mL DNA}$.

A qualidade é medida pela relação de absorvância A_{260}/A_{280} . Proteínas têm pico de absorvância de 280 nm e essas podem ser possíveis contaminantes da solução de DNA. Assim sendo, espera-se que a relação A_{260}/A_{280} esteja entre 1,8 e 2,0. A relação inferior a 1,8 sugere contaminação com proteína. Após a constatação desses parâmetros, a solução estoque de DNA foi diluída a 70 ng/µL como solução uso. Ambas foram congeladas em freezer a -20°C.

2.3.3. Desenho dos *primers*

O gene da proteína JY-1 possui cerca de 16 kb, sendo constituído por três éxons com 25 pb, 92pb e 1400 pb (éxons 1, 2 e 3, respectivamente) e dois íntrons de 12,8 kb e 1,5 kb (íntrons 1 e 2, respectivamente) (BETTEGOWDA et al 2007). A região codificante da proteína está nos éxons 2 e 3. A princípio, dois pares de *primers* foram

desenhados na região codificante, todavia, não se obteve sucesso na amplificação usando-se os pares de *primers* para o éxon 2. Assim, pares de *primers* para outra região do éxon 3, que é uma região 3' UTR, foram desenhados.

Os pares de *primers* específicos para regiões do éxon 3 do gene JY-1 foram feitos por meio do uso do programa Primer3 disponível no site (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) e a qualidade foi verificada pelo site (<http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>) em que se procurou optar por *primers* com ΔG maior que zero, que não formassem *hairpin*, dímeros de um mesmo primer e entre *primers*.

2.3.4. Reação de Amplificação de DNA por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)

As amostras de DNA genômico tiveram as regiões do éxon 3 do gene JY-1 amplificadas por PCR (Reação em cadeia de Polimerase), em reações de um volume final de 15 μ L, contendo 1,5 μ L de DNA (105 ng) , 1,5 μ L de cada um dos *primers* (15 pM), 7,5 μ L de GoTaq Colorless Master Mix e 4,0 de água (nuclease free).

Os *primers* utilizados foram 5'CTTCACAGACCACCCAGGTC3' e 5'TCTGCCCTGTTCAGTTTGAT3' que amplificaram uma região de 399pb (do nucleotídeo 3 ao nucleotídeo 401 do éxon 3) que compreendia parcialmente a região codificante e (par de *primers* 3A) 5'ATCAAACCTGAACAGGGCAGA3' e 5'AAGTATGACAAGAGATACGGTCAGG3' que amplificaram uma região de 373 pb (do nucleotídeo 382 a 754 do éxon 3) que compreendia uma região 3'UTR (par de *primers* 3B). Os ciclos de amplificação seguiram a programação em termociclador MasterCycler Gradient 5331 Eppendorf[®], Alemanha, 2005. Foi feita uma PCR gradiente a fim de identificar a temperatura ideal de anelamento dos *primers* que foi de 57 °C para ambos os pares.

O ciclo seguiu a programação: primeiro passo: 95°C por 5 minutos para desnaturação inicial, segundo passo: 95°C por 1 minuto para desnaturação, terceiro passo: 57°C por 1 minuto para anelamento dos *primers*, quarto passo: 72°C por 1 minuto para extensão da Taq Polimerase, quinto passo: 72°C por 5 minuto para

extensão final da Taq Polimerase (Tabela 1). O ciclo repetiu-se do segundo ao quarto passos por 35 vezes. Após o quinto passo, as amostras foram mantidas a 4^o C até a retirada do termociclador.

Tabela 1. Programação do termociclador utilizado nas reações de PCR

Passo	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)	Ação
1 ^o	95	5	Desnaturação inicial
2 ^o	95	1	Desnaturação
3 ^o	57	1	Pareamento dos <i>primers</i>
4 ^o	72	1	Extensão
5 ^o	72	5	Extensão final

Após a amplificação, uma alíquota de 3 µl de cada amostra foi diluída com 2 µL de tampão de corrida (4µL/mL de gelred) e foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (1,5 %), em tampão TBE 1 X (Tris-HCl 89 mM; EDTA 2,5 mM e Ácido Bórico 89 mM e pH 8,3) a 90 V, por aproximadamente 50 minutos. A visualização foi feita em luz UV, o gel foi fotodocumentado em aparelho Gel-Doc (Bio-Rad) e analisado com o software Image Analysis da Kodak, visando avaliar a eficiência da PCR em função do tamanho do fragmento amplificado. As amostras foram mantidas a 4^oC até análises pela técnica de SSCP.

2.3.5. Técnica de SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)

A técnica de SSCP consiste na exposição dos fragmentos de DNA a uma reação físico-química, objetivando-se quebrar as pontes de hidrogênio da dupla fita a fim de que ocorra um rearranjo entre as fitas simples. A ocorrência de uma simples mudança de base nitrogenada na fita simples de uma amostra, pode gerar uma estruturação diferenciada na cadeia, que irá alterar o padrão de migração das bandas evidenciando o polimorfismo. Os produtos de PCR obtidos foram submetidos a essa técnica a fim de se verificar os padrões de migração gerados.

Uma alíquota de 3 μ L de cada amostra amplificada na PCR foi diluída em 6 μ L de Tampão SSCP (95% de formamida, 20mM EDTA, 0,05% de azul de bromofenol, 0,05% de xileno-cianol), de acordo com a metodologia descrita por ORITA et al. (1989). Em seguida as amostras foram desnaturadas a 95 °C por 10 minutos e incubadas em gelo por igual intervalo de tempo, sendo em seguida submetidas à eletroforese em gel de acrilamida:bis-acrilamida (49:1) em condição não desnaturante, utilizando o sistema mini-protean II da BioRad. Para cada produto de PCR que foi analisado, foi feita uma padronização do tempo de corrida e da concentração do gel de poliacrilamida. Os geis serão preparados utilizando-se acrilamida:bis (49:1) suficiente para atingir a concentração desejada, 4 mL de TBE 10X (0,9 M Tris, 0,02 M EDTA, 0,09 M ácido bórico e pH 8,3), 70 mg de persulfato de amônio diluídos em 500 μ L e 40 μ L de TEMED e água milli-Q para completar o volume de 36 mL. Para visualização do DNA no gel de poliacrilamida após a eletroforese, os geis serão corados com nitrato de prata, segundo o método de BASSAN et al. (1991).

2.3.6. Sequenciamento

A partir dos diferentes padrões de migração encontrados pela técnica de SSCP, as amostras de DNA foram amplificadas novamente para um volume final de 15 μ L. Os produtos de PCR foram submetidos à purificação, seguindo o protocolo recomendado pelo kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega, EUA.

O produto de PCR foi sequenciado a partir de ambos *primers* (*forward* e *reverse*) usando a técnica de terminação de cadeia por dideoxynucleotídeos (ddNTPs), descrita por SANGER et al. (1977) utilizando o ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, (Applied Biosystems) em um sequenciador automático ABI 3730 XL (Applied Biosystems) em serviço terceirizado pelo laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Departamento de Tecnologia da FCAV.

Para a análise e identificação dos polimorfismos, as sequências obtidas foram analisadas e visualizadas com os programas CodonCode Aligner disponível no site (<http://www.codoncode.com/aligner/download.htm>).

No caso de todos os animais apresentarem o mesmo padrão de migração para a técnica de SSCP para um determinado par de *primers*. Selecionaram-se vinte animais menos aparentados entre si para sequenciamento direto dos produtos de PCR a fim de tentar encontrar possíveis polimorfismos.

2.3.7. Técnica de RFLP (Restricted Fragment Length Polymorphism)

Após análise das sequências obtidas, os fragmentos amplificados que possuíam polimorfismos detectáveis por clivagem de enzima de restrição foram analisados através da técnica de PCR-RFLP. A técnica é menos trabalhosa e mais precisa que o SSCP. Ela consiste na digestão por enzimas de restrição que reconhecem sequências palindromônicas específicas de bases nitrogenadas do DNA. A alteração de um par de bases pode criar ou abolir um sítio de restrição em um determinado locus do genoma, identificando um polimorfismo. A escolha da enzima de restrição foi feita pela ferramenta NEBcutter 2.0 disponível no site da BioLabs (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>).

Sendo assim, o produto de PCR foi digerido em um programa do termociclador MasterCycler Gradient 5331 Eppendorf[®], Alemanha, 2005, com tempo e temperatura descrito no protocolo fornecido pelo fabricante das enzimas (*BsrI* – BioLabs), utilizando-se 10 µL da reação de amplificação, 1/10 de tampão para a enzima de restrição e 5 unidades da enzima de restrição em um volume final de 15 µL.

Após a digestão, os fragmentos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (2%), em tampão TBE 1X (Tris-HCl 89 mM; EDTA 2,5 mM e Ácido Bórico 89 mM e pH 8,3) com 4µL/mL de gelred a 100V, por aproximadamente 1 hora e 30 minutos. A visualização das bandas foi feita em luz ultravioleta (UV), o gel foi fotodocumentado em aparelho Gel-Doc (Bio-Rad) e analisado com o software Image Analysis da Kodak.

2.4. Análises estatísticas

2.4.1. Frequências alélicas e genotípicas

As frequências alélicas (x_i) para as variantes do gene JY-1 (i), e genotípicas para o genótipo (ii), foram estabelecidas para a população, pelas Equações 1 e 2:

$$x_i = \frac{2n_{ii} + n_{ij}}{2n}$$

$$x_{ii} = \frac{n_{ii}}{n}$$

Em que n_{ii} e n_{ij} correspondem ao número de homozigotos e heterozigotos observados no alelo i , respectivamente; n corresponde ao número de indivíduos analisados.

2.4.2. Teste de aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg

Pelo teorema de Hardy-Weinberg, as frequências genotípicas esperadas, em equilíbrio, podem ser estimadas a partir da expansão do binômio:

$$(x_i + x_j)^2 = x_i^2 + 2x_ix_j + x_j^2$$

Em que x_i^2 = frequência esperada dos homozigotos para o alelo i ; $2x_ix_j$ = frequência esperada para heterozigotos ij ; x_j^2 = frequência esperada dos homozigotos para o alelo j .

2.4.3. Desequilíbrio de ligação

O desequilíbrio de ligação (r^2) foi estimado com o uso do programa computacional Plink (disponível no site <http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink/>) com o objetivo de verificar quais os SNPs segregavam juntos.

Considerando-se dois *loci* com dois alelos para cada *locus* (A1/A2 e B1/B2), tem-se que:

$r^2 = D^2 / [\text{freq}(A1) * \text{freq}(A2) * \text{freq}(B1) * \text{freq}(B2)]$ (HILL E ROBERTSON, 1966) em que:

$$D = \text{freq}(A1_B1) * \text{freq}(A2_B2) - \text{freq}(A1_B2) * \text{freq}(A2_B1) \text{ (HILL, 1981).}$$

2.4.4. Análises de associação entre as variantes encontradas e os fenótipos características estudadas.

Os dados fenotípicos de precocidade sexual consistiram na verificação de prenhez ou não das novilhas expostas na estação de monta. A característica probabilidade de prenhez precoce (PPP) foi definida como a probabilidade da novilha conceber e permanecer prenhe à palpação (em torno de 60 dias após o término da estação de monta), dado que foi exposta durante estação de monta. Novilhas precoces foram classificadas como aquelas que pariram antes dos 31 meses de idade. A novilha prenha será codificada com “1” e as não prenhas com “0”.

As análises foram realizadas utilizando modelos lineares generalizados através do aplicativo PROC GLIMMIX do pacote estatístico do SAS 8.0 (SAS Institute, Inc., 2000), assumindo uma distribuição binomial para os dados com uma função de conexão logística. O efeito dos genótipos identificados para o gene JY-1 na PPP foi estimado usando o seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ijklm} = \mu + N_i + C_m + S_j + JY_k + T_l + e_{ijklm}$$

Onde Y_{ijklm} = característica PPP para o $ijklm^{\text{ésimo}}$ animal; μ = média da característica na população; N_i = efeito fixo associado ao $i^{\text{ésimo}}$ grupo de manejo ao nascimento; C_m = efeito fixo associado ao $m^{\text{ésimo}}$ grupo de manejo à desmama; S_j = efeito fixo associado ao $j^{\text{ésimo}}$ grupo de manejo ao sobreano; JY_k = efeito fixo associado ao $k^{\text{ésimo}}$ genótipo de JY-1; T = efeito aleatório do $l^{\text{ésimo}}$ touro; e_{ijklm} = erro aleatório associado com a $ijklm^{\text{ésima}}$ observação.

Além da característica de probabilidade de prenhez precoce, foram analisadas as características de ganho médio diário pré e pós desmama e peso ao sobreano. O ganho médio diário expressa a taxa de crescimento nos diferentes períodos e é a razão entre a diferença de pesos e o tempo transcorrido para que o animal atinja o peso estipulado. No caso do ganho pré-desmama é o ganho de peso entre o nascimento e a desmama e no pós-desmama, entre a desmama e o sobreano. As pesagens de desmama e sobreano ocorreram aos 205 dias e 550 dias, respectivamente.

As análises foram realizadas utilizando modelos lineares através do aplicativo PROC MIXED do pacote estatístico do SAS 8.0 (SAS Institute, Inc., 2000), assumindo distribuição normal dos dados. O efeito dos genótipos identificados para o gene JY-1 no ganho pré e pós-desmama foi estimado usando o modelo estatístico com efeitos semelhantes ao de PPP. Para ganho pré-desmama, retirou-se S_j e inclui-se idade do bezerro à desmama como covariável (efeito linear) e para ganho pós-desmama inclui-se idade do bezerro ao sobreano como covariável (efeito linear). Para ambos, inclui-se também o efeito fixo de idade da vaca ao parto.

O teste F de Fisher foi utilizado no estudo do efeito dos marcadores para as características, considerando valores de $P < 0,05$ como sendo significativos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.4. Extração de DNA e verificação da qualidade

Os resultados obtidos para a extração de DNA foram de excelente quantidade, pois as amostras tinham concentração maior que 100ng/μL e qualidade, com relação 260/280 entre 1,80 e 2 (Tabela 2), possibilitando a utilização do material com sucesso na continuação do experimento. Algumas amostras apresentaram o valor da relação 260/280 acima de 2, sugerindo provável contaminação por fenol ou RNAm, mas isso não interferiu nas reações de amplificação.

Tabela 2. Exemplo de concentrações de DNA obtidas após extração pelo método de Fenol-Clorofórmio-Álcool Isoamílico a partir de folículos pilosos de bovinos e quantificados pelo aparelho NanoDrop®.

Animal	Concentração (ng/μL)	Relação 260/280
2780	318,01	1,88
2911	319,76	1,90
2896	498,43	2,02
3016	325,52	2,03
3012	722,57	1,94
2979	555,7	2,02
2967	707,2	1,82
2922	563,36	2,02
2586	1005,1	1,99

2.5. *Primers* utilizados nas reações de PCR (Polymerase Chain Reaction).

Foram desenhados dois pares de *primers* para amplificação e posteriores análises. Ambos os pares de *primers* amplificavam regiões do éxon 3 do gene da proteína JY-1. Um dos pares de *primers* (3A) compreendia do nucleotídeo de posição 3 até o nucleotídeo de posição 401 do éxon 3, correspondendo a parte da região codificante e

parte da região 3'UTR; e o outro (3B) compreendia do nucleotídeo 381 ao 754 do éxon 3, correspondendo a parte da região 3'UTR (Tabela 3).

As sequências disponíveis para o gene JY-1 eram de cDNA (acessos: EF642496 e EF642497 no Genbank). Todavia, BETTEGOWDA et al 2007 descreveram a quantidade e tamanho dos éxons. Assim, baseado na sequência do genoma parcial do cromossomo 29 (acesso: NC_007330.4), estabeleceu-se a posição dos éxons e dos íntrons, possibilitando o desenho dos *primers* nas regiões almejadas.

Tabela 3. *Primers* desenhados para amplificação de parte do gene da proteína JY-1.

P	Localização	Sequência	A
3A	Éxon 3 (codificante + 3'UTR)	<i>Foward</i> : CTTCACAGACCACCCAGGTC <i>Reverse</i> : TCTGCCCTGTTTCAGTTTGAT	399
3B	Éxon 3 (3'UTR)	<i>Foward</i> : TCAAACACTGAACAGGGCAGA <i>Reverse</i> : AAGTATGACAAGAGATACGGTCAGG	373

P = nome do primer, A= tamanho do amplicon (pb)

2.6. Técnica da PCR (Restricted Fragment Length Polymorphism)

Ambos pares de *primers* amplificaram as regiões específicas do éxon 3 do gene da proteína JY-1 (Figuras 1 e 2). Os tamanhos correspondiam aos tamanhos indicados anteriormente. Observa-se na Figura 1 que o fragmento amplificado parece ter um tamanho um pouco superior ao indicado, isso decorre do fato de ter-se usado o corante gelred em substituição ao brometo de etídio. Foi feita uma reação em um termociclador gradiente e ambos os *primers* tiveram sua temperatura de anelamento otimizadas a 57 °C.

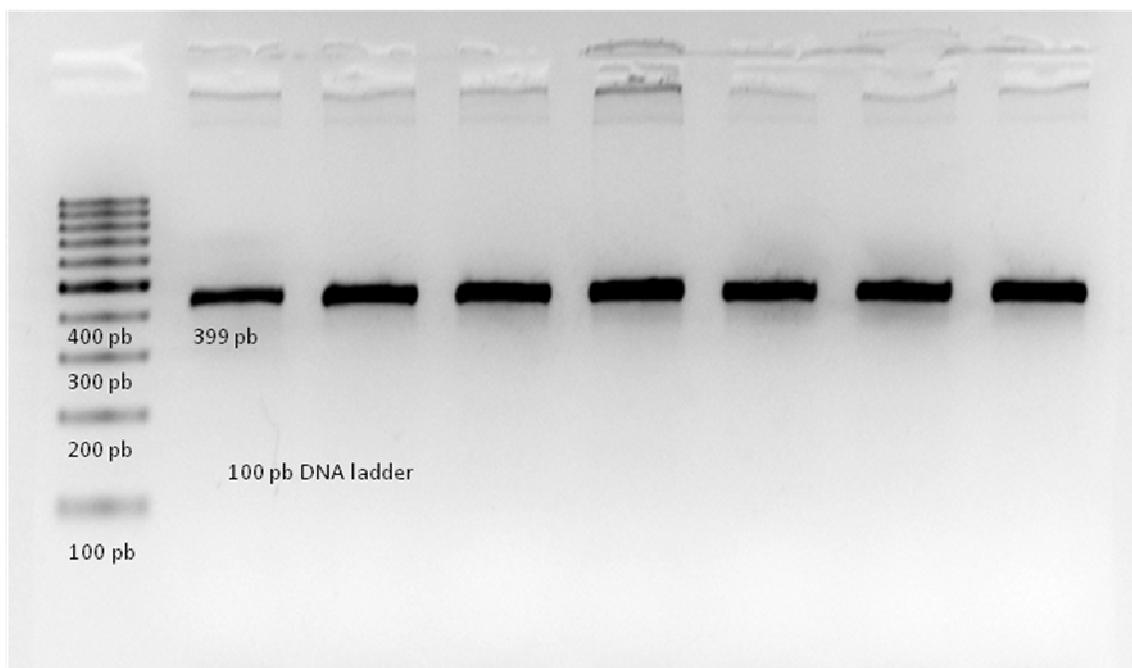


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose evidenciando os fragmentos de 399 pb amplificados por PCR com uso iniciadores específicos (3A) para o éxon 3 da proteína JY-1 em bovinos.

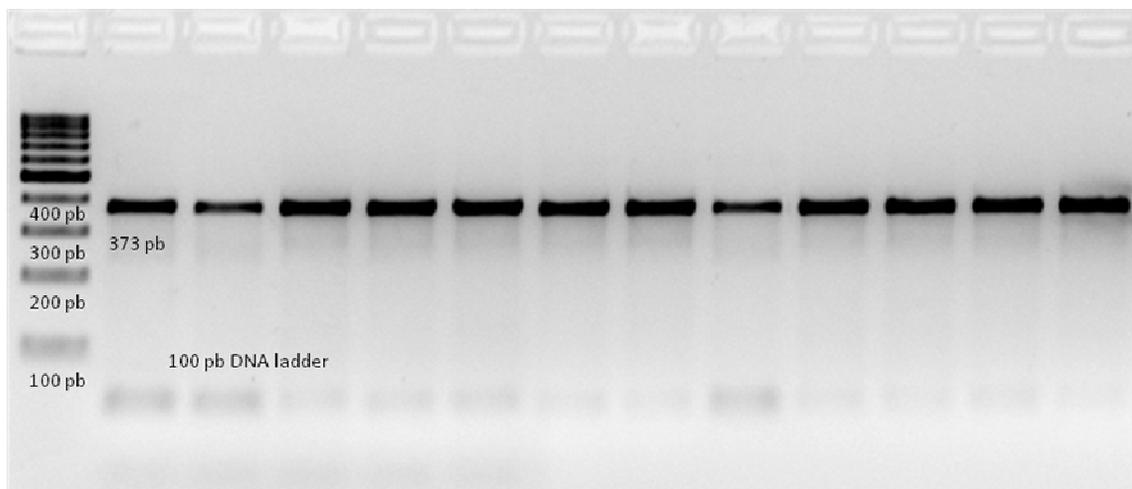


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose evidenciando os fragmentos de 373 pb amplificados por PCR com uso iniciadores específicos (3B) para o éxon 3 da proteína JY-1 em bovinos.

2.7. Técnica de SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)

Foram feitas reações de SSCP para ambos os pares de *primers*. Para o par de *primers* 3A, 200 produtos de PCR foram analisados (de novilhas precoces e não precoces), todavia todos os animais foram monomórficos: exibiram um padrão de migração com quatro bandas. Devido ao insucesso obtido por essa técnica, optou-se por fazer o sequenciamento do produto amplificado para 20 novilhas menos aparentadas entre si (sendo 10 precoces e 10 não precoces) a fim de se verificar a existência de polimorfismo (procedimento descrito no item seguinte).

Para o par de *primers* 3B, foram analisados 200 produtos de PCR pela técnica de SSCP. Houve identificação de dois padrões de migração diferentes: um padrão com três bandas e um padrão com duas bandas (Figura 3). Aparentemente, o padrão de três bandas tratava-se de um heterozigoto e o padrão com duas bandas, de um homozigoto. Reações de contraprova, que são repetições das corridas das amostras com padrão de migração diferentes, foram feitas e os padrões repetiram-se. Escolheu-se um produto amplificado de cada padrão de migração para fazer a reação de sequenciamento e verificar a existência de polimorfismo.

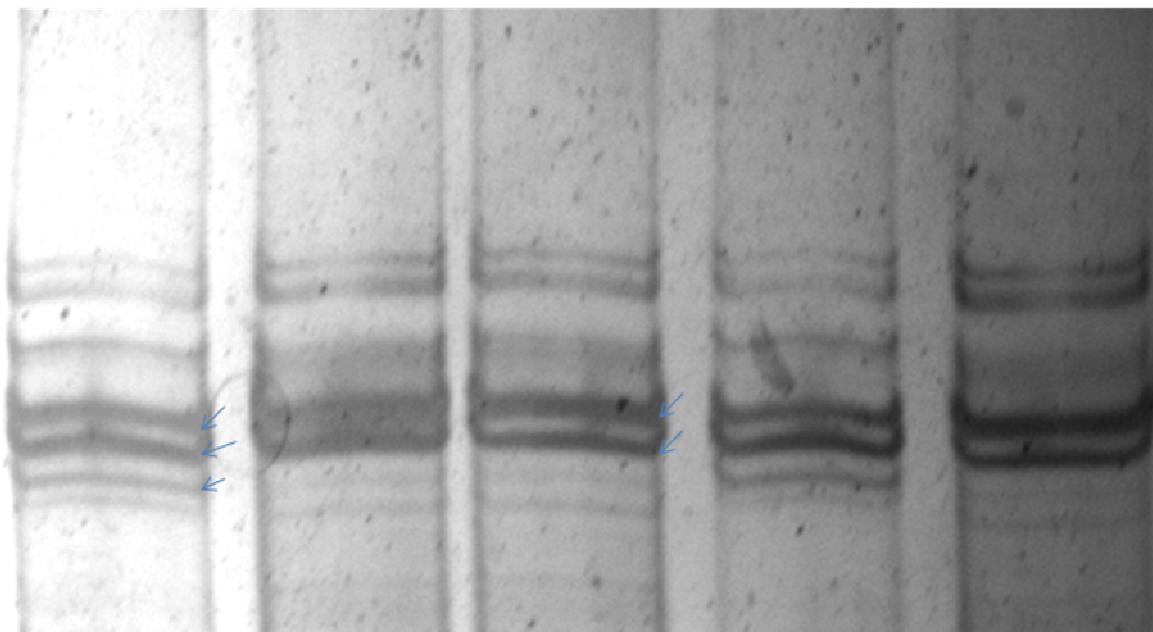


Figura 3. Foto de eletroferograma representativo dos dois padrões de migração obtidos pela técnica de SSCP para região parcial do éxon 3 do gene da proteína JY-1. Flechas indicam as bandas dos dois padrões distintos (3 e 2 bandas).

2.8. Sequenciamento

Os produtos de PCR amplificados que tinham como iniciadores os pares de *primers* 3A e 3B foram sequenciados em um equipamento ABI 3730 XL (Applied Biosystems). Os eletroferogramas permitiram a investigação de SNPs. Na Figura 4, encontra-se região parcial do produto amplificado pelo par de *primers* 3A.

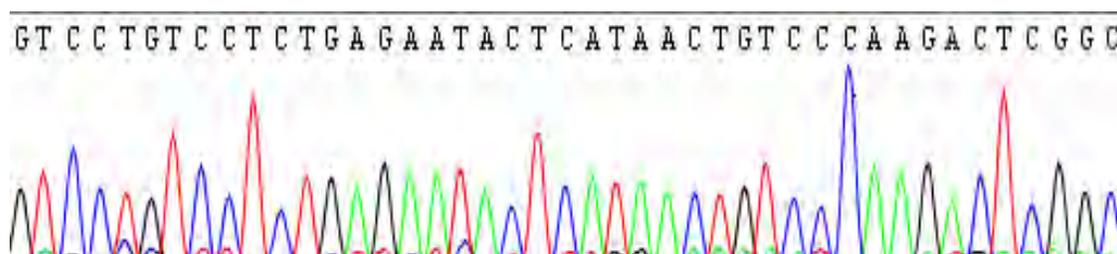


Figura 4. Cromatograma obtido do sequenciamento produto de PCR de região parcial do éxon 3 do gene da proteína JY-1 obtido pelos pares de primer 3A.

Para os produtos 3A, foram utilizadas 20 novilhas menos aparentadas entre si (sendo 10 precoces e 10 não precoces) na prospecção dos SNPs, pois na reação de SSCP obtivera-se monomorfismo. Os animais não possuíam pais, mães ou avós paternos e maternos em comum.

Para os produtos 3B, foi utilizado um animal de cada padrão obtido no SSCP nas reações de sequenciamento a fim de se confirmar o polimorfismo. Também foram feitas reações de sequenciamento das 20 novilhas menos aparentadas. Em ambos os casos, os fragmentos foram sequenciados pelo em reações com os *primers forward* e *reverse* a fim de se obter maior aproveitamento do início e fim da região estudada.

O polimorfismo foi identificado pela presença de dois picos de cor diferente no eletroferograma em indivíduos heterozigotos bem como por comparação em indivíduos homozigotos usando-se o programa CodonCode Aligner (Figura 5). A anotação dos genótipos dos animais foi feita alinhando-se e comparando-se as seqüências de cada um dos animais.

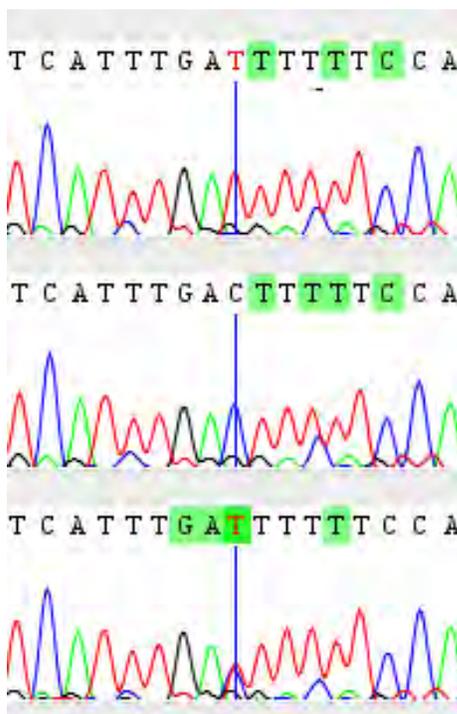


Figura 5. Saída da análise da seqüência de três animais no programa CodonCode Aligner com exemplo de um SNP identificado. A primeira seqüência refere-se a um animal homozigoto TT, a segunda refere-se a um animal homozigoto CC e a última a um animal heterozigoto TC (dois picos).

Foram identificados sete polimorfismos do tipo SNP para a região parcial do éxon 3 do gene da proteína JY-1 através do sequenciamento dos vinte animais menos aparentados. Três deles na região amplificada pelos *primers* 3A (posições 163, 281 e 321 do éxon 3) e quatro na região amplificada pelos *primers* 3B (posições 532, 652, 679 e 722 do éxon 3). Um deles está presente em região codificante (posição 163 do éxon 3) e os demais em região 3'UTR.

Segue abaixo a Tabela 3 descrevendo os SNPs encontrados no éxon 3 do gene da proteína JY-1.

Tabela 4. Indicação da posição, região e substituição dos SNPs identificados e número de acesso das sequências depositadas no NCBI.

Localização no éxon 3 (pb)	primer	região	SNP	Número de acesso no NCBI
163	3A	codificante	T/C	JN592587
281	3A	3'UTR	T/C	JN592587
321	3A	3'UTR	T/C	JN592587
532	3B	3'UTR	T/C	JF262042.2
652	3B	3'UTR	A/G	JF262042.2
679	3B	3'UTR	T/C	JF262042.2
722	3B	3'UTR	G/C	JF262042.2

Esses são os primeiros polimorfismos descritos para o gene da proteína JY-1 em bovinos. O SNP presente na posição 163 é uma substituição de uma citosina por uma timina promovendo a substituição do aminoácido 77 de prolina por leucina. Ambos os aminoácidos são não polares com grupo R alifático.

O sequenciamento confirmou que a técnica do SSCP foi eficiente para a detecção do polimorfismo na posição 532.

As sequências e os polimorfismos obtidos no presente trabalho foram submetidas ao NCBI (National Center for Biotechnology Information) (Disponível em: www.ncbi.nlm.nih.gov) e catalogadas pelos números de acesso JN592587 e JF262042.2.

2.9. Genotipagem dos SNPs em toda a população

2.9.1. Sequenciamento direto

Os produtos de PCR amplificados pelos pares de primer 3A tinham polimorfismo que causava a troca de uma aminoácido na proteína (SNP T/C na posição 163 do éxon 3) e devido à impossibilidade de se genotipar os animais por RFLP (Restricted Fragment Length Polymorphism), pois não se encontraram enzimas de restrição para genotipar todos os SNPs, optou-se por fazer sequenciamento direto do fragmento amplificado no equipamento ABI 3730 XL (Applied Biosystems). Assim, as 297 novilhas foram genotipadas para os SNPs nas posições 163, 281 e 321. As descrições das frequências alélicas e genotípicas estão no item 3.6.3.

2.9.2. Técnica de RFLP (Restricted Fragment Length Polymorphism)

Um dos quatro polimorfismos presentes no fragmento amplificado pelo par de *primers* 3B (SNP 679) foi genotipado pela técnica de RFLP. A escolha da enzima de restrição foi feita pela ferramenta NEBcutter 2.0 disponível no site da BioLabs (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>).

Para genotipagem das 297 novilhas, utilizou-se a enzima de restrição *BsrI* (5'...ACTGG↓N...3'). As reações de digestão com a endonuclease originaram três padrões de migração. Um deles possuía um fragmento: o fragmento original 373 pb (CC), o outro três fragmentos cujos tamanhos eram 373 pb, 298 pb e 75 pb (TC) e o outro com 298 pb e 75 pb (TT). Nem sempre o fragmento de 75 pb era visível (Figura 6). As descrições das frequências alélicas e genotípicas estão no item 3.6.3.

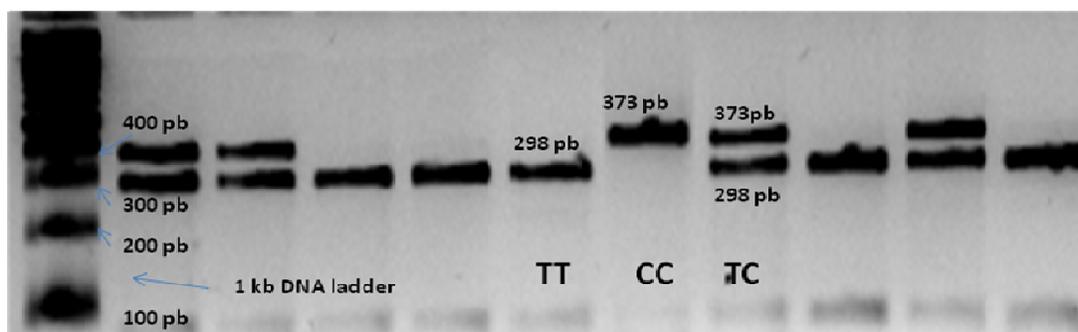


Figura 6. Foto de eletroferograma representativo dos três padrões de migração obtidos pela técnica PCR-RFLP/ BsrI para região parcial do éxon 3 do gene da proteína JY-1: CC (373 pb), TC(373 pb e 298 pb) e TT (298 pb).

2.10. Análises estatísticas

2.10.1. Frequências alélicas e genotípicas

As frequências alélicas e genotípicas para os polimorfismos no gene JY-1 encontram-se na Tabela 5. As frequências alélicas possuem boa distribuição não sendo nenhuma menor que 0,10. Isso é bom, pois a estatística de associação não será penalizada pela discrepância acentuada da distribuição das frequências. Três das quatro frequências genotípicas não se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg pelo teste de χ^2 a 5%, indicando que esses *loci* podem estar sob processo de seleção.

Tabela 5. Frequências alélicas e genotípicas para os SNPs do gene JY-1 genotipados na população de 297 novilhas e adesão ao equilíbrio de Hardy-Weinberg a 5%.

SNP	Frequências alélicas		Frequências genotípicas			Equilíbrio de Hardy-Weinberg
	C	T	CC	TC	TT	
163	0,82	0,18	0,70	0,23	0,07	não
281	0,81	0,19	0,69	0,25	0,06	não
321	0,82	0,18	0,70	0,23	0,07	não
679	0,16	0,84	0,02	0,29	0,69	sim

2.10.2. Desequilíbrio de ligação

Na tabela 6, encontram-se os valores estimados de r^2 entre os quatro SNPs genotipados em toda a população.

Tabela 6. Valores estimados de r^2 para quatro SNPs (163, 281, 321 e 679) no gene JY-1.

SNPs	163	281	321
163	-	-	-
281	0,052	-	-
321	0,949	0,039	-
679	0,396	0,008	0,4

Considerou-se que se o r^2 for maior que 0,33, o desequilíbrio de ligação é forte (ARDLIE et al., 2002). Os valores de r^2 variaram de 0,008 a 0,949. Os SNPs 163, 321 e 679 apresentaram valores r^2 maiores que 0,33 entre si (variando de 0,396 a 0,949), significando que estão em desequilíbrio e são herdados juntos. Esse grupo de SNPs está em equilíbrio com o SNP 281 representado pelos baixos valores de r^2 (variando de 0,008 a 0,052). A possível explicação para o equilíbrio do SNP 281 para com os outros é a ocorrência de dois eventos de *crossing-over*, um antes e um depois do SNP 281, gerando o equilíbrio apresentado. Portanto, foram utilizados nas análises estatísticas de associação os SNPs 163 e 281.

O fato que o SNP 679 estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg, diferentemente dos outros e que estava em desequilíbrio de ligação com os SNPs 163 e 321 sugere os resultados obtidos para equilíbrio de Hardy-Weinberg com um número amostral pequeno, como é o caso, é pouco indicativo da realidade e que seu uso como indicativo se o locus está ou não sob seleção deve ser visto com cuidado.

2.10.3. Resultado das análises de associação dos SNPs com valores fenotípicos das características analisadas.

Os SNPs encontrados foram correlacionados com as características de prenhez precoce aos 16 meses, ganho médio diário pré-desmama, ganho médio diário pós-desmama e peso ao sobreano avaliadas em 297 novilhas da raça Nelore (Tabela 7).

Tabela 7. Valores de *P* dos SNPs encontrados para características estudadas.

SNP	Características ¹			
	PPP	Gpre	Gpos	PS
163	0,2503	0,3117	0,297	0,4433
281	0,7519	0,4365	0,5075	0,1862

¹PPP = probabilidade de prenhez precoce, ganho pré-desmama, Gpre = ganho médio diário pré-desmama, Gpós = ganho médio diário pós-desmama, PS = peso ao sobreano

Nessas análises, nenhum SNP foi encontrado como significativo ao nível de 5%. Isso indica que os SNPs do éxon 3 do gene JY-1 contribuem pouco para as características analisadas.

Como essas são as associações dos primeiros SNPs a serem detectados no gene da proteína JY-1 de bovinos não há como comparar esses resultados com outros. O gene também não foi descrito ainda em outras espécies, há apenas similaridade para a região 3'UTR em algumas.

Para a característica de probabilidade de prenhez precoce, é difícil encontrar estudos de biologia molecular. Essa é uma característica que é de interesse para aqueles que trabalham com raças zebuínas e, portanto em ambiente tropical. MILAZZOTTO et al (2008) encontraram 3 SNPs em região 3'UTR do gene FSHR correlacionados com precocidade sexual em bovinos e concluíram que maiores estudos

em genes candidatos devem ser feitos a fim de melhor explicar essa característica. Estudos em outras regiões desse gene e em outros genes, principalmente se tiverem sido prospectados por análises genômicas (FORTES et al, 2010 e FORTES et al, 2011) podem ser feitos a fim de encontrar regiões mais significativas.

FORTES et al (2010, 2011) justificaram o estudo de características binárias por marcadores moleculares, principalmente na era da seleção genômica. Os autores relatam que é difícil encontrar a ponderação correta usando um modelo mais conservador (que fornece pequenas associações de SNPs, porém extremamente significativas) ou menos conservador (fornecendo muitas associações de SNPs, mas potencialmente falsas) sendo que o estudo de genes candidatos pode auxiliar na avaliação genética.

MARSON et al. (2008) estudaram SNPs nos os genes LHR e FSHR em 370 novilhas de diferentes composições raciais zebu-auricular. Ainda, não foram encontradas associações com probabilidade de prenhez. LAUREANO et al. (2009) estudaram polimorfismos para o gene IGF-I em grupos precoces e não precoces de novilhas Nelore. Ainda, associações não foram feitas com probabilidade de prenhez precoce devido à disparidade das frequências alélicas. ANDREA et al (2011) estudaram o polimorfismo na posição 127 do gene do hormônio GH em animais da raça Nelore avaliados para precocidade. Esse locus já foi correlacionado com características de crescimento. Ainda, ele apresentou-se monomórfico para o alelo Leu.

FORTES et al (2010, 2011) propuseram metodologia inovadora que combina análises genômicas com informações de bancos de dados de expressão gênica a fim de prospectar genes que influenciariam na puberdade em bovinos Brahman. Como a metodologia privilegia genes que codificam proteínas que servem como fatores de transcrição e que atuam no hipotálamo, o gene JY-1 não foi listado. Entretanto, pelo seu papel biológico, ele pode influenciar as características reprodutivas.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo permitem inferir que:

Foi feita a caracterização parcial do éxon 3 do gene JY-1 em bovinos da raça Nelore com descoberta dos primeiros polimorfismos para o gene na espécie. Há um SNP na posição 163 do éxon 3 que promove uma troca de uma prolina por uma leucina, podendo essa influenciar o papel biológico da proteína. Ressalta-se que estudos posteriores a fim de caracterizar outras regiões de interesse no mesmo gene são importantes.

Polimorfismos no éxon 3 do gene da proteína JY-1 não foram associados com probabilidade de prenhez precoce aos 16 meses e ganho médio diário pré-desmama, ganho médio diário pós-desmama e peso ao sobreano em novilhas da raça Nelore. Entretanto, outros polimorfismos no mesmo gene poderão influenciar essas e outras características, principalmente reprodutivas. Sendo assim, estudos posteriores não necessários a fim de melhorar entender a dinâmica desse gene e sua influência nas características de importância comercial.

REFERÊNCIAS

- ANDREA, M. V. et al. Relação entre polimorfismo do gene do hormônio do crescimento e características de precocidade em novilhas da raça Nelore. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, p.153-157, 2011.
- ARDLIE, K. G. et al. Patterns of linkage disequilibrium in the human genome. **Nature Reviews Genetics**, v. 3, p. 299-309, 2002.
- BASSAN, B.J.; ANOLLÉS, G.C.; GRESSHOFF, P.M. – Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrilamide gels. **An. Biochem.**, v.196, p. 80-3, 1991.
- BETTEGOWDA, A. et al JY-1, an oocyte-specific gene, regulates granulosa cell function and early embryonic development in cattle **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.104, p.17602-17607, 2007.
- BOLIGON, A. A.; ALBUQUERQUE, L.G. Genetic parameters and relationships of heifer pregnancy and age at first calving with weight gain, yearling and mature weight in Nelore cattle. **Livestock Science**, v.141, p.12–16, 2011.
- BRUMATTI, R. C. FERRAZ, R. C., ELER, J. P. Desenvolvimento de índices de seleção em gado de corte sob enfoque de um modelo bioeconômico. **Archivos de Zootecnia.**, v.60, p. 205-213, 2011.
- ELER, J. P. et al. Additive genetic relationships between heifer pregnancy and scrotal circumference in Nelore cattle. **Journal of Animal Science**, vol. 82, p. 2519–2527, 2004.
- FORTES, M. R. S. et al. Association weight matrix for the genetic dissection of puberty in beef cattle. **PNAS**, v.107, p. 13642–13647, 2010.

FORTES, M. R. S. et al. A single nucleotide polymorphism-derived regulatory gene network underlying puberty in 2 tropical breeds of beef cattle. **Journal of Animal Science**, v.89, p.1669–1683, 2011.

HILL, H. G. Estimation of effective population size from data on linkage disequilibrium. **Genetical Research**, v. 38, p. 209-216, 1981.

HILL, H. G., ROBERTSON, A The effect of linkage on limits to artificial selection. **Genetical Research**, v. 8, p. 269-294, 1966.

LAUREANO, M.M.M. et al. Characterization and polymorphism screening of IGF-I and prolactin genes in Nelore heifers. **Ital. J. Anim. Sci.** v. 8, p. 277-283, 2009.

LIMA, S. P. G. Estudo do polimorfismo da região promotora do gene do hormônio de crescimento bovino (bGH), em rebanhos Nelore selecionados para peso pós-desmama. 2003. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

MACKAY, T. F. C.; STONE, E. A.; AYROLES, J. F. The genetics of quantitative traits: challenges and prospects. **Nature Reviews**, v.10, p. 565-577, 2009.

MARSON, E. P. et al Effects of polymorphisms of LHR and FSHR genes on sexual precocity in a *Bos taurus* x *Bos indicus* beef composite population. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, n.1, p. 243-251, 2008.

MILAZZOTTO, M. P. et al New molecular variants of hypothalamus–pituitary–gonad axis genes and their association with early puberty phenotype in *Bos taurus indicus* (Nelore). **Livestock Science**, v. 114, p. 274–279, 2008.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** v. 74, n.12, p. 5463-5467, 1977.

SAS INSTITUTE. User's guide. Cary: SAS Institute, 2000.

SILVA, J. A. II V.; DIAS, L. T.; ALBUQUERQUE, L. G. Estudo genético da precocidade sexual de novilhas em um rebanho Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n.5, p.1568-1572, 2005.

SHIOTSUKI, L.; SILVA, J. A. II V; TONHATI, H. et al Genetic associations of sexual precocity with growth traits and visual scores of conformation, finishing, and muscling in Nelore cattle. **Journal of Animal Science**, v.87, p.1591-1597, 2009.

TERAKADO, A. P. N. **Associações genéticas entre perímetro escrotal e características reprodutivas de fêmeas da raça Nelore**. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2010.

VAN MELIS, M. H. et al. Additive genetic relationship of longevity with fertility and production traits in Nelore cattle based on bivariate models **Genetics and Molecular Research**, v.9, p.176-187, 2010.

WEE, G. et al Role of the bovine oocyte-specific protein JY-1 in regulation of messenger RNA abundance for genes linked to cumulus expansion. **Reproduction Fertility and Development**, v. 22, p. 285-285, 2010.