

Genética da prolificidade e seu emprego na produção ovina *Genetics of prolificacy and its application to sheep production*

Carlos José Hoff de Souza¹, Eduardo Oliveira Melo², José Carlos Ferrugem Moraes¹

¹Embrapa Pecuária Sul, CEP 96401-970, Bagé, RS, Brasil

²Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, CEP 70770-900, Brasília, DF, Brasil

E-mail: csouza@cppsul.embrapa.br

Resumo

A existência de rebanhos de ovinos que apresentam alta frequência de partos múltiplos tem sido observada desde há muito tempo, mas apenas recentemente foi identificada a causa genética da prolificidade de algumas destas populações. Mutações nos genes das proteínas morfogenéticas de osso (BMP) e seu receptor foram apontadas como causadoras do aumento da taxa de ovulação e por consequência dos partos múltiplos de diversas populações de ovelhas dentre elas as conhecidas como Booroola. O desenvolvimento de testes de DNA eficazes com capacidade de identificação precoce e rápida destes haplótipos tornou possível a sua utilização na produção comercial de ovinos. O uso racional destas ovelhas possibilita até duplicar a produção de cordeiros desmamados.

Palavras-chave: prolificidade, Booroola, cordeiro, gêmeos, ovinos, parto múltiplo.

Abstract

The existence of sheep flocks with high frequency of multiple births has been observed for some time, but only recently the genetic cause of the prolificacy of some of these populations has been identified. Mutations in the genes of the bone morphogenetic proteins and their receptor have been recognized as the cause of the increased ovulation rate and hence the occurrence of multiple births in several sheep populations among them those know as Booroola. The development of efficient DNA tests capable of early and quick detection of these haplotypes made possible their application in the commercial sheep industry. The rational use of these ewes can in some case duplicate the production of weaned lambs.

Keywords: Booroola, lamb, multiple birth, prolificacy, twin, sheep.

Introdução

A observação de rebanhos com alta prolificidade tem sido constatada ao redor do mundo por algum tempo. Muitos destes rebanhos foram identificados como segregando genes de efeitos principal na taxa de ovulação e tipo de parto. Recentemente foram identificadas mutações em genes da família das BMPs e no receptor para BMP tipo 1 B como responsáveis pelo aumento da taxa de ovulação e da prolificidade destas ovelhas. O objetivo desta revisão é dar uma visão geral sobre as BMPs no ovários dos ovinos, apresentar um histórico da mutação Booroola no Brasil e mostrar exemplos do seu uso na produção ovina.

BMPs no crescimento folicular ovariano

O crescimento dos folículos ovarianos é controlado da forma endócrina clássica através do estímulo das gonadotrofinas hipofisárias (FSH e LH) que são reguladas por retroalimentação pelos hormônios produzidos pelo ovário notadamente os esteróides e a inibina (para revisão ver Moraes *et al.*, 2008). Entretanto a foliculogênese também sofre regulação parácrina através de fatores de crescimento produzidos dentro do próprio ovário pelos diversos tipos celulares nele contidos. Desde o início desta década fatores de crescimento da família das BMPs que são membros da superfamília do Fator de Crescimento Transformante (TGF) beta estão sendo apontados como chaves no controle local do crescimento folicular ovariano e da determinação da taxa de ovulação (para revisão ver Shimasaki *et al.*, 2004).

As BMPs agem através de receptores serina/treonina com um único domínio transmembrana, que existem como dois subtipos, tipo 1 e tipo 2 sendo que este último é constitutivamente fosforilado. Ambos os tipos possuem baixa afinidade pelo "ligante" quando de forma isolada, mas quando em associação são capazes de ligação de alta afinidade. A ligação do ligante ao receptor tipo 2 em associação com o do tipo 1 leva a formação de um complexo heterotetramérico de receptores e fosforilação do receptor tipo 1. Depois que o receptor tipo 1 foi fosforilado, este transfosforila proteínas Smad do citoplasma da célula (Smad 1,5 ou 8), estas então heterodimerizam com o Smad comum (Smad 4). Este complexo de proteínas Smad fosforilado migra para o núcleo da célula e se associa com fatores de transcrição nucleares ativando a transcrição dos genes alvo

(Massague, 1998; Miyazono *et al.*, 2001).

Nos ovários dos ovinos os receptores para BMPs (BMPR) estão localizados predominantemente na camada granulosa dos folículos desde o estágio de folículo primário até o de folículo antral grande (BMPR1A, BMPR1B e BMPR2). Embora eles também estejam presentes no ovócito, corpo lúteo, epitélio superficial do ovário e em menos intensidade na camada da teca do folículo (Souza *et al.*, 2002).

Nos ovinos o mRNA para o fator de crescimento e diferenciação 9 (GDF9) está localizado nos ovócitos dos folículos desde o estágio de primordial até o de folículo antral grande (Bodensteiner *et al.*, 1999), enquanto que a expressão de mRNA da BMP15 começa nos ovócitos dos folículos primários (Galloway *et al.*, 2000). Análises de Northern Blot de tecidos ovinos demonstraram que as BMPs 4 e 7 são fortemente expressas nas células da granulosa e da teca, a BMP2 está restrita a camada granulosa enquanto que a BMP6 é expressa no ovócito (Souza *et al.*, 2003).

Cultivos *in vitro* de células da granulosa em sistema livre de soro tratadas com a mesma concentração de FSH a adição de BMP2 aumentou a produção de estradiol e inibina A que são marcadores da diferenciação celular compatível com a seleção do folículo ovulatório, sem causar aumento na proliferação celular (Souza *et al.*, 2002). Usando o mesmo sistema de cultivo foi confirmado efeito similar na diferenciação de células da granulosa da adição de BMP4 e BMP6 (Campbell *et al.*, 2006).

Mutações determinantes de prolificidade em ovinos

Atualmente se sabe da existência de pelo menos doze genes com efeito principal na taxa de ovulação dos ovinos. A maioria destes foi identificado na Nova Zelândia que foi o primeiro país a efetuar um levantamento sistemático da ocorrência desta característica nos seus rebanhos (Davis, 2005). Destes, em pelo menos a metade, o mecanismo genético determinante da prolificidade é conhecido (Tab. 1).

Tabela 1 Genes principais afetando a taxa de ovulação em ovinos, os quais a causa genética foi identificada (adaptado de Souza *et al.* 2007)

Mutação	Gene	Base	Aminoácido	Localização proteína
Galway	BMP15	C718T	Gln239STOP	Pré-peptídeo
Aragonesa	BMP15	525deleção541	truncado	Pré-peptídeo
Hanna	BMP15	C871T	Glu291STOP	Peptídeo maduro
Inverdale	BMP15	T896A	Val299Asp	Peptídeo maduro
Lacaune	BMP15	G963A	Cys321Tyr	Peptídeo maduro
Belclare	BMP15	C1100T	Ser367Ile	Peptídeo maduro
High Fertility	GDF9	C1184T	Ser395Phe	Peptídeo maduro
Booroola	BMPR1B	A746G	Gln249Arg	Domínio Intracelular

No Brasil, recentemente foi descrita nas raças deslanadas Santa Inês, Morada Nova e Rabo Largo uma nova mutação no gene do GDF9 que foi denominada de "Embrapa" (Fec^G) e leva a uma substituição de uma fenilalanina por uma cisteína (F345C) no peptídeo maduro (Castro *et al.*, 2006). Até o momento, esta mutação não foi encontrada em ovelhas de raças lanadas (Castro *et al.*, 2006). Nas investigações preliminares tem sido constatado que esta mutação provoca aumento significativo na taxa ovulatória quando em homozigose, mas não apresenta efeito nas ovelhas heterozigotas, entretanto a frequência de ovelhas com ovulações múltiplas foi superior nas portadoras da mutação (Melo *et al.*, 2008). Este fenótipo difere radicalmente de todas as mutações descritas em fatores de crescimento oriundos do ovócitos pois todas até então (Tab. 1) provocam aumento na taxa de ovulação em ovelhas heterozigotas e esterilidade nas ovelhas homozigotas (para revisão ver Souza *et al.*, 2007).

Ovelhas Booroola no Brasil

O fenótipo Booroola foi identificado em ovelhas Merino na Austrália, no final da década de setenta, como sendo causado por um gene principal com efeito aditivo sobre a taxa de ovulação e dominância sobre o tipo de parto (Bindon, 1984). Recentemente este fenótipo foi associado a uma mutação de ponto no domínio da quinase do gene do receptor para proteínas morfogenéticas de osso 1 B (BMPR1B), causada por uma transição de A para G na posição 746, substituindo uma glutamina no alelo normal por uma arginina na posição 249 (Q249R) da proteína mutante (Mulsant *et al.*, 2001; Souza *et al.*, 2001; Wilson *et al.*, 2001).

No Brasil a mutação Booroola foi introduzida pela Embrapa Pecuária Sul através da importação de carneiros portadores no início da década de oitenta, quando foi avaliada a produtividade das ovelhas mutantes nas condições extensivas de criação do Rio Grande do Sul, sendo constatado aumento da prolificidade, acompanhada de proporcional aumento na mortalidade dos cordeiros. Nessas condições, o número de quilos de cordeiros desmamados por ovelha acasalada nos portadores foi superior, com efeito significativo de "ano", sugerindo que os efeitos ambientais são os principais fatores responsáveis pela variação na produção anual de

cordeiros (Villaroel *et al.*, 1990). Neste período também foram validados critérios de classificação dos genótipos, baseados em laparoscopias exploratórias seqüenciais para as fêmeas, e, em teste de progênie para os machos (Moraes *et al.*, 1991).

Durante a década de noventa o genótipo Booroola foi usado no Brasil somente como modelo experimental para a implementação de estudos sobre fisiologia da reprodução (Souza *et al.*, 1994). Mais recentemente, o uso dessa mutação vem sendo avaliado em rebanhos comerciais das raças Texel e Corriedale e resultou no desmame de mais de 130% cordeiro por ovelha acasalada e na produção de cordeiros com peso ajustado aos 100 dias entre 20-30 kg (Souza *et al.*, 2006).

Desde 2003, foi iniciado um programa de introgressão assistida por diagnóstico molecular desta mutação em rebanhos comerciais das raças ovinas com maior efetivo no Rio Grande do Sul. Participaram deste projeto oito propriedades da região sul do Estado sendo quatro com rebanhos da raça Texel e quatro com rebanhos da raça Corriedale. Foram feitas pelo menos cinco progênies de retro-cruzamento totalizando mais de dois mil acasalamentos orientados pela genotipagem. No momento estão disponíveis no mercado carneiros das raças Texel e Corriedale portadores da mutação Booroola (BN) certificados por genotipagem e com padrão racial atestado pela Associação Nacional de Criadores de Ovinos. O desempenho produtivo das ovelhas BN na Embrapa Pecuária Sul nos últimos três anos foram na média de 193% de cordeiros nascidos/ovelha parida (prolificidade), 162% de cordeiros desmamados/ovelha parida (produtividade) e produziram 32 quilos de cordeiro desmamado aos 90 dias por ovelha parida. Considerando a média histórica de desmame de cordeiros no RS que é cerca de 70%, a introdução da mutação Booroola aliada a técnicas simples de manejo propicia duplicar a produção de cordeiros desmamados mantendo o sistema de criação extensivo a pasto que é comum na região. Resultados similares também estão sendo obtidos em propriedades particulares da região como pode ser visto em um exemplo na Tab. 2.

Tabela 2 Dados de produção de um rebanho comercial da região da sul do Rio Grande do do Sul composto de ovelhas portadoras (BN) ou não (NN) da mutação Booroola

Indicador produtivo	BN (%)	NN (%)	Geral (%)
Prolificidade	190,0	106,2	120,5
Produtividade	155,0	99,0	108,5
Sobrevivencia de cordeiros	81,6	93,2	90,1
Quilos de cordeiro desmamado aos 70 dias/ovelha parida	26,8	23,9	24,2

Conclusões

A determinação da causa genética da prolificidade dos ovinos através da identificação de mutações nos fatores parácrinos das BMPs e seu receptor abriram uma porta para seu uso como uma forma de rapidamente aumentar a prolificidade dos rebanhos. A facilidade na introgressão e no manejo desta característica determinada pela disponibilidade de testes de DNA rápidos e eficazes permite seu uso em rebanhos comerciais. O aumento da prolificidade das ovelhas aliada a melhor manejo do rebanho de cria tem o potencial para duplicar o número de cordeiros desmamados quando comparado com os índices usualmente obtidos nos sistemas de criação extensiva aplicados no sul do Brasil.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pelo CNPq processo número 472591/2004-5 e Embrapa projeto 03.06.5.025.02

Referências

- Bindon BM.** Reproductive biology of the Booroola Merino sheep. *Aust J Biol Sci*, v.37, p.163-189, 1984.
- Bodensteiner KJ, Clay CM, Moeller CL, Sawyer HR.** Molecular cloning of the ovine Growth/Differentiation factor-9 gene and expression of growth/differentiation factor-9 in ovine and bovine ovaries. *Biol Reprod*, v.60, p.381-386, 1999.
- Campbell BK, Souza CJH, Skinner A, Webb R, Baird DT.** Enhanced response of granulosa and theca cells from sheep carriers of the FecB mutation in vitro to gonadotropins and bone morphogenic protein-2, -4, and -6. *Endocrinology*, v.147, p.1608-1620, 2006.
- Castro EA, Lopez IMR, Lim A, Franco MM, Paiva SR, Souza CJH, Rumpf R, Melo EO.** Characterization of a new SNP in the Growth and Differentiation Factor 9 (GDF-9) gene, specific for the Brazilian Santa Ines Sheep. *In: World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*, 8, 2006, Belo Horizonte, MG, Brazil.

Proceedings ... Belo Horizonte: WCGAP, 2006. CD-ROM.

Davis GH. Major genes affecting ovulation rate in sheep. *Genet Sel Evol*, v.37, suppl. 1, S11-S23, 2005.

Galloway SM, McNatty KP, Cambridge LM, Laitinen MP, Juengel JL, Jokiranta TS, McLaren RJ, Luiro K, Dodds KG, Montgomery GW, Beattie AE, Davis GH, Ritvos O. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nat Genet*, v.25, p.279-283, 2000.

Massague J. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem*, v.67, p.753-791, 1998.

Melo EO, Silva B, Castro EA, Silva T, Paiva SR, Sartori R, Franco MM, Souza CJH, Neves JP. A novel mutation in the Growth and Differentiation Factor 9 (GDF9) gene is associated, in homozygosis, with increased ovulation rate in Santa Ines sheep. *In: Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction*, 41, 2008, Kailua-Kona, Hawaii. *Proceedings ...* Madison, WI: Society for the Study of Reproduction, 2008. p.152-153.

Miyazono K, Kusanagi K, Inoue H. Divergence and convergence of TGF-beta/BMP signaling. *J Cell Physiol*, v.187, p.265-276., 2001.

Moraes JCF, Oliveira NM, Villaroel AS. Evaluation of three criteria used to identify F-gene carriers in a Romney x Merino Booroola sheep flock in South Brazil. *Braz J Genet*, v.14, p.983-989, 1991.

Moraes JCF, Souza CJH, Gonçalves PBD, Freitas VJF, Lopes Junior ES. Controle do estro e da ovulação em ruminantes. *In: BIOTÉCNICAS Aplicadas a Reprodução Animal*. 2 ed. São Paulo: Roca, 2008. v.1, p.33-56.

Mulsant P, Lecerf F, Fabre S, Schibler L, Monget P, Lanneluc I, Pisselet C, Riquet J, Monniaux D, Callebaut I, Crihiu E, Thimonier J, Teyssier J, Bodin L, Cognie Y, Chitour N, Elsen JM. Mutation in bone morphogenetic protein receptor-IB is associated with increased ovulation rate in Booroola Merino ewes. *Proc Nat Acad Sci USA*, v.98, p.5104-5109, 2001.

Shimasaki S, Moore RK, Otsuka F, Erickson GF. The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endocr Rev*, v.25, p.72-101, 2004.

Souza CJH, Campbell BK, Mcneilly AS, Baird DT Effect of bone morphogenetic protein 2 (BMP2) on oestradiol and inhibin A production by sheep granulosa cells, and localization of BMP receptors in the ovary by immunohistochemistry. *Reproduction*, v.123, p.363-369, 2002.

Souza CJH, Campbell BK, Mcneilly AS, Baird DT. Bone morphogenetic proteins and folliculogenesis: lessons from the Booroola mutation. *Reproduction Suppl*, n.61, p.361-370, 2003.

Souza CJH, Jaume CM, Moraes JCF. Introdução da mutação Booroola em rebanhos comerciais e avaliação ponderal dos cordeiros (resultados preliminares). *In: Jornadas Uruguayas de Buiatria*, 34, 2006, Paysandu. Paysandu: Jornadas Uruguayas de Buiatria, 2006. p.182-183.

Souza CJH, MacDougall C, Campbell BK, Mcneilly AS, Baird DT. The Booroola (FecB) phenotype is associated with a mutation in the bone morphogenetic receptor type 1 B (BMPRII) gene. *J Endocrinol*, v.169, p.R1-6, 2001.

Souza CJH, Melo EO, Moraes JCF, Baird DT. Role of bone morphogenetic proteins in follicle development. *In: Gonzalez-Bulnes A (Ed.). Novel concepts in ovarian endocrinology*. Kerala, India: Transworld Research Network, 2007.p.27-42.

Souza CJH, Moraes JCF, Chagas LM. Effect of the Booroola gene on time of ovulation and ovulatory dynamics. *Anim Reprod Sci*, v.37, p.7-13, 1994.

Villaroel AS, Moraes JCF, Oliveira NM, Silveira VCP Introdução e avaliação dos efeitos de um gene determinante de prolificidade em ovinos Romney Marsh. *Rev Bras Reprod Anim*, v.14, p.215-221, 1990.

Wilson T, Wu XY, Juengel JL, Ross IK, Lumsden JM, Lord EA, Dodds KG, Walling GA, Mcewan JC, O'connell AR, McNatty KP, Montgomery GW. Highly prolific booroola sheep have a mutation in the intracellular kinase domain of bone morphogenetic protein IB receptor (ALK-6) that is expressed in both oocytes and granulosa cells. *Biol Reprod*, v.64, p.1225-1235, 2001.