

Efeito do gene receptor de prolactina sobre características quantitativas de interesse econômico em suínos

Effect of prolactin receptor gene on the quantitative characteristics of economic interest on pigs

Vivian ALONSO¹;
Bárbara Amélia Aparecida SANTANA¹;
Waldesse PIRAGE Junior¹;
Luiz Ricardo GOULART¹;
Heyder da Silva DINIZ¹;
Maurício Franco MACHAIM¹;
Graciele Segantini Nascimento BORGES¹

1- Departamento de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica do Laboratório de Genética Molecular da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia - MG

Resumo

O aumento da produtividade e qualidade dos produtos animais vem se tornando de grande interesse econômico. A prolactina (PRL) é um hormônio essencial para o sucesso reprodutivo e seu receptor (RPRL) tem sido detectado em vários tecidos². O gene RPRL foi recentemente mapeado em suínos no cromossomo 16⁶. Este trabalho teve como objetivo analisar a frequência genotípica do RPRL em três diferentes raças de suíno, Landrace, Large White e Pietrain e correlacionar os genótipos com características de interesse. Foram analisados um total de 124 animais. O DNA foi extraído de sangue total suíno e submetido a técnica de PCR-RFLP, para determinação do genótipo do gene do receptor da prolactina. As análises estatísticas mostraram que o genótipo RPRL teve efeito sobre peso médio diário na raça Landrace ($p < 0,0135$). As médias de DEPGMD na raça Landrace também foram diferentes em relação ao genótipo ($p < 0,0610$), confirmando a análise dos dados reais de Ganho de Peso Médio Diário. Métodos de seleção assistida por marcadores, juntamente com métodos de seleção tradicional poderão ser utilizados para potencializar e acelerar o melhoramento de características de interesse econômico em suínos, onde o gene do receptor de prolactina (RPRL) poderá ser utilizado como um marcador molecular para o ganho de peso médio diário real e sua DEP.

Palavras-chave

Prolactina.
Receptores.
Genes.
Suínos.

Correspondência para:
VIVIAN ALONSO
Laboratório de Genética Molecular
Faculdade de Medicina Veterinária - UFMG
Av. Pará, 1720 - Campus Umuarama - Bloco 2T
38400-902 - Uberlândia - MG
e-mail: vivialonso@hotmail.com

Recebido para publicação: 02/10/2002
Aprovado para publicação: 03/06/2003

Introdução

O aumento da produtividade e qualidade dos produtos animais vem se tornando de grande interesse econômico. A prolactina (PRL) é um hormônio essencial para o sucesso reprodutivo e seu receptor (RPRL) tem sido detectado em vários tecidos incluindo cérebro,

ovário, placenta e útero de diversas espécies domésticas¹. O gene RPRL tem sido recentemente mapeado em suínos no cromossomo 16, seu locus está ligado a três marcadores: S0006 (LOD-10.29), GHR (6.35), S0077 (3.23), na região 16q1.4 ou 16q2.2-2.3².

Os hormônios de crescimento e prolactina demonstram considerável

homologia estrutural e de efeitos biológicos. Os receptores dos hormônios de crescimento e da prolactina consistem em uma cadeia de polipeptídeo com uma região transmembrana simples, onde a região extracelular contém cisteínas ligadas a pontes dissulfeto e sítios para glicosilação, já a parte intracelular que media ações biológicas disparam considerável heterogeneidade de tamanho. O alto grau de homologia é demonstrado entre a parte extracelular destes receptores e receptores de um grande número de citoquininas, interferons e fatores de crescimento que juntos formam uma família de receptores chamados citoquinas/hormônio do crescimento/família do receptor de prolactina³. Devido a grande identidade de sequência entre as regiões curta e longa do receptor de prolactina e receptor do hormônio de crescimento, sugere-se que eles originem-se de um ancestral comum¹. Segundo Sakai et al.⁴ a prolactina e o hormônio de crescimento se ligam aos mesmos receptores.

Este trabalho teve como objetivo analisar a frequência genotípica do RPRL em três diferentes raças de suíno, Landrace, Large White e Pietrain e correlacionar os genótipos com características de interesse econômico (ganho de peso médio diário, espessura de toucinho, tamanho de leitegada).

Material e Método

Este projeto foi desenvolvido no Laboratório de Genética Molecular da Universidade Federal de Uberlândia. As amostras de sangue suíno foram cedidas pela empresa Granja Rezende S/A, localizada no município de Uberlândia-MG.

Foram analisados um total de 124 animais de três raças diferentes, sendo 54 animais da raça Landrace, 39 Large

White e 31 Pietrain. O DNA foi extraído de sangue total suíno e uma quantidade de 50 ng foi submetida a técnica de PCR-RFLP, para determinação da frequência alélica do gene receptor da prolactina. Os dados de DEP (diferença esperada na progênie) para tamanho de leitegada (DEPTL), espessura de toucinho (DEPET) e ganho de peso médio diário (DEPGMD) foram obtidos no banco de dados da empresa, os quais foram estimados a partir de um modelo animal completo sob BLUP (Best Linear Unbiased Prediction). Foi realizada análise também com dados reais de ganho de peso médio diário (GMD), espessura de toucinho (ET) e número de leitões nascidos vivos (NV) no primeiro parto (Parto 1) e Segunda e demais ordens de parto (Parto 2).

Extração de DNA

O sangue foi coletado através de punção da veia marginal da orelha utilizando o sistema de coleta a vácuo, contendo anticoagulante. Após a coleta, o sangue foi homogeneizado lentamente, para evitar hemólise. Depois da homogeneização, que também tinha como propósito evitar a formação de coágulos, os frascos foram acondicionados em caixas isotérmicas com gelo e enviados ao Laboratório de Genética Molecular - UFU, onde já devidamente identificados, foram mantidos a uma temperatura de 4°C por 72 horas (tempo suficiente para sedimentação da camada de leucócitos). Em seguida procedeu-se a extração de DNA, realizada segundo um protocolo da Pharmacia adaptado por Borges⁵.

Foram tomados 500 µl de sangue na transição entre plasma e eritrócitos, após sedimentação. Inicialmente, o volume de sangue foi colocado em um microtubo de centrífuga de 2 ml, então adicionou-se o mesmo volume de tampão de lise não diluído (20 mM de Tris-HCl, 640 mM de sacarose, 10 mM

de $MgCl_2$ e 4.00% de Triton X-100), agitou-se lentamente e incubou-se em gelo por 30 minutos. Procedeu-se então uma primeira centrifugação a 4000 g por 1 minuto, seguida por duas lavagens com tampão de lise diluído duas vezes, intercaladas por alguns minutos de incubação no gelo (10 minutos). Após a obtenção de um precipitado livre de hemoglobinas, adicionou-se 200 ul de tampão de extração (100 mM Tris-HCl, pH 7.5 e 5 M de guanidina) e incubou-se a 60°C até que o precipitado fosse totalmente ressuspenso, o que levava aproximadamente 30 minutos. Acrescentou-se, então, 100 ul do tampão de precipitação (150 mM de Tris-HCl, pH 7,5 e 1,225 M de Acetato de Amônio), agitou-se suavemente por cerca de 5 minutos. Adicionou-se 300 ul de isopropanol gelado, agitando-se suavemente até precipitar o DNA. Centrifugou-se a 4000 g por 5-10 minutos, descartou-se o sobrenadante, procedeu-se mais duas lavagens do precipitado de DNA (centrifugações a 4000 g, 1-2 minutos) com 500 ul de isopropanol 60.00% ou etanol 70.00%, secou-se o precipitado sob vácuo ou em estufa a 60°C e dilui-se em 300-500 ul de tampão TE (10 mM Tris- HCl e 1 mM de EDTA). Foram necessárias de 1-2 horas de incubação a 75°C para completa diluição do precipitado.

Como o processo de extração já está bastante otimizado, dispensou-se o uso do espectrofotômetro e fez-se utilização de 2 ul de DNA diluído em tampão TE, sem que este estivesse sido previamente quantificado.

Genotipagem para o gene receptor de prolactina

Para genotipagem dos animais foi utilizada a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR). Em seguida, o produto da PCR foi digerido com enzima de restrição, que cliva o DNA em sítios de restrição específicos (PCR-RFLP).

Cada reação foi realizada com um volume total de 20 ul contendo 1 unidade de Taq Polimerase, 100 uM de dntps, 1,5 mM de $MgCl_2$ e 5 pcomol de primers (5'- CCC AAA ACA GCA GGA GAA CG – 3' e 5'- GGC AAG TGG TTG AAA ATG GA – 3'). As condições da PCR foram 93° C por 3 minutos, 35 ciclos de 93° C por 30 segundos, 60° C por 1 minuto, 72° C por 1 minuto e uma extensão final a 72° C por 3 minutos. Dez ul do produto da PCR foram digeridos com 3 unidades da enzima AluI, durante a noite.

Eletroforese

Finalmente, após a amplificação e restrição pela PCR-RFLP, foram adicionados a 20 ul de cada reação, 5 ul de tampão de carregamento (0,125.00% azul de bromofenol, 0,125.00% de xileno cianol e 12,50% de ficoll 400 ou 50,00% de glicerol), e essas amostras foram submetidas à técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida 10,00% e corados por prata. O padrão de bandas foi fotografado em VDS Imagesystem – Pharmacia (Figura 1).

Análises dos dados

Foi realizada a análise estatística entre genótipos RPRL e os dados de DEP para tamanho de leitegada (DEPTL), espessura de toucinho (DEPET) e ganho de peso médio diário (DEPGMD) e, também para dados reais de ganho de peso médio diário (GMD), espessura de toucinho (ET) e número de leitões nascidos vivos (NV) no primeiro parto (Parto 1) e Segunda e demais origens de parto (Parto 2).

Os dados foram analisados segundo o procedimento MIXED (MIXED Procedures) do Software SAS versão 6.0 (1992), o qual computa estimativas do teste F baseado no teste de máxima verossimilhança restrita. A

estrutura de dados (que leva em consideração várias características ao mesmo tempo) não permite a análise com o procedimento GLM do mesmo Software.

Foram realizadas análises para cada raça em separado, devido a divergência genética existente entre elas.

A análise estatística entre os genótipos RPRL e dados observados foi realizada segundo o modelo misto (efeito fixos e aleatórios) descrito a seguir:

$$Y_{ijkl} = m + G_i + CG_j + P_k + b(P_{ijkl} - PI...) + e_{ijkl}$$

Onde:

Y_{ijkl} = é a observação da característica (GMD, ET, NV no Parto 1 e no Parto 2, DEP GPMD, ET e TL) no i^{th} genótipo, j^{th} grupo contemporâneo;

m = média geral

G_i = efeito do i^{th} genótipo assumindo valor 1 para AA, 2 para AB e 3 para BB;

CG_j = efeito do j^{th} grupo contemporâneo

P_k = pai considerado como efeito aleatório

$b(P_{ijkl} - PI...)$ = covariável peso inicial (peso do animal no início dos testes para ganho de peso e espessura de toucinho);

e_{ijkl} = resíduo aleatório com distribuição normal e independentemente distribuído com média zero e variância s^2

O peso inicial (PI) só foi utilizado como covariável para as características GMD e ET, ajustando todos os dados de GMD e ET para o PI médio, pois cada animal entra no teste com um piso diferente.

O genitor paterno foi considerado como efeito aleatório para evitar que o efeito do genótipo fosse confundido com o efeito de pai.

Em todas as análises utilizou-se o efeito de grupo contemporâneo, onde os animais foram agrupados por prédio de nascimento (alojamento),

mês e ano de nascimento, sexo e prédio de testes (manejo) para ganho de peso e medida de espessura de toucinho, com isso pretendeu-se considerar todos os efeitos ambientais que poderiam estar afetando o efeito do genótipo RPRL.

As estimativas das DEP (GMD, ET e TL), são obtidas por meio de um modelo animal completo sob BLUP (University of Nebraska). O modelo misto linear geralmente usado para estimativas de DEP é o seguinte:

$$y = Xb + Za + e$$

Onde,

Y = $n \times 1$ vetor de observações;

n = número de registros

B = $p \times 1$ vetor de efeitos fixos;

p = número de níveis para efeitos fixos;

A = $q \times 1$ vetor de efeitos aleatórios; q = número de níveis para efeitos aleatórios

Resultados e Discussão

Após a amplificação e restrição enzimática do gene RPRL observou-se fragmentos polimórficos de 90 e 110pb, em gel de poliacrilamida 10,00%, corado com prata (Figura 2).

Foram detectados animais com genótipos AA (homozigoto para o fragmento de 90pb), AB (heterozigoto apresentando os fragmentos de 90 e 110pb) e BB (homozigoto para o fragmento de 110pb). A frequência genotípica do RPRL foi de 62,80% de AB, 17,00% de AA e 21,20% de BB (Tabela 1).

Análise das características quantitativas

Os valores estimados das DEP são calculados a partir de um modelo animal completo sob BLUP, considerando os efeitos residuais, os quais incluem efeitos de ambiente e genéticos não-aditivos, portanto, a associação de qualquer variável com

uma DEP, já está considerando os efeitos não controlados, ou seja, a análise deve ser mais fidedigna. No entanto, para se comparar dados reais com os valores estimados das DEP, utilizou-se defeitos de PI (peso inicial) e GC (grupo contemporâneo) para minimizar os efeitos ambientais (não controlados) sobre as características. Mesmo para DEP que já considera os efeitos residuais, pode haver diferença entre as DEP estimadas para indivíduos que nasceram em anos diferentes, os animais mais novos devem apresentar melhores valores de

DEP, o que é resultado da seleção.

Os animais com ordem de parto maior ou igual a 2 foram tratados como ordem de parto igual a 2, pois as diferenças de ordem de parto após o segundo não são significativas, isso foi tomado como uma estratégia para diminuir o número de tratamentos. Segundo Rothschild et al.⁶, a diferença no tamanho de leitegada entre o primeiro parto e os demais partos pode refletir que as diferenças genéticas para tamanho de leitegada nas fêmeas mais velhas e fisiologicamente similares são reduzidas ou mascaradas pelos efeitos ambientais,

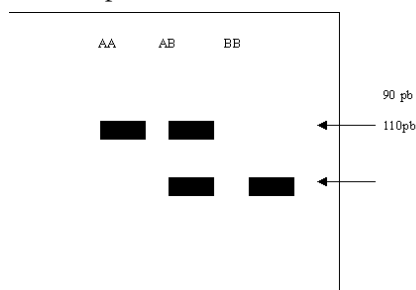


Figura 1

Desenho esquemático de um gel de poliácridamida apresentando três possíveis genótipos após a restrição enzimática, com as respectivas bandas e pesos moleculares (AA-banda de 90 pb; AB – banda de 90 e 110 pb e BB- 110 pb)

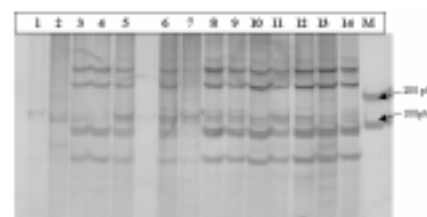


Figura 2

Deteção do produto de amplificação do gene receptor de prolactina por meio de eletroforese em gel de poliácridamida 10,00%, corado por prata. (M) Marcador de peso molecular; (1) e (2) amostras de animais com genótipo BB e (3) a (14) amostras de animais com genótipo AB

Tabela 1

Frequência genotípica do receptor de prolactina nas raças Landrace, Large White e Pietrain de 124 animais analisados

| Raça | Genótipo AA (%) | Genótipo AB (%) | Genótipo BB (%) |
|-------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Landrace | 14,8 | 61,1 | 24,1 |
| Large White | 23,1 | 56,4 | 20,5 |
| Pietrain | 12,9 | 71,0 | 16,1 |
| Total | 17,0 | 62,8 | 21,2 |

Tabela 2

Médias corrigidas para dados desbalanceados (LSMEANS) e erro padrão (entre parênteses) de GMD (Kg) e DEPGMD (g), ET (mm) e DEPET (mm), NV (número de leitões) no primeiro parto e DEPTL (número de Leitões) nas raças Landrace, Large White e Pietrain em relação ao genótipo

| | | MÉDIAS – (ERRO) | | | | | | | | | |
|------------|----|--------------------|----------------------|---------------------|---------------------|--------------------|---------------------|--|--|--|--|
| | | GMD | DEPGMD | ET | DEPET | NV | DEPTL | | | | |
| LANDRACE | AA | 1,03 (0,03) | 67,70 (7,07) | 15,90 (0,93) | -0,42 (0,14) | 8,72 (1,34) | 0,29 (0,11) | | | | |
| | AB | 0,91 (0,02) | 48,93 (3,34) | 17,04 (0,42) | -0,43 (0,16) | 8,64 (0,61) | 0,19 (0,09) | | | | |
| | BB | 0,91 (0,03) | 56,44 (5,81) | 16,90 (0,72) | -0,38 (0,12) | 10,58 (0,89) | 0,34 (0,11) | | | | |
| LARGEWHITE | AA | 0,99 (0,06) | 33,17 (13,24) | 16,90 (1,13) | -0,24 (0,22) | 5,96 (1,25) | -0,04 (0,04) | | | | |
| | AB | 0,98 (0,04) | 39,57 (8,69) | 17,20 (0,75) | -0,09 (0,15) | 9,18 (0,77) | -0,04 (0,02) | | | | |
| | BB | 1,07 (0,06) | 43,88 (14,56) | 19,73 (1,25) | 0,19 (0,25) | 7,29 (1,82) | -0,07 (0,05) | | | | |
| PIETRAIN | AA | 0,75 (0,04) | 36,20 (6,89) | 15,99 (0,98) | -0,13 (0,10) | 1,65 (2,48) | 0,04 (0,14) | | | | |
| | AB | 0,74 (0,02) | 41,13 (3,38) | 14,63 (0,51) | -0,12 (0,05) | 8,65 (0,79) | 0,11 (0,07) | | | | |
| | BB | 0,89 (0,06) | 41,47 (8,86) | 14,30 (0,73) | -0,07 (0,02) | 8,15 (2,21) | 0,14 (0,15) | | | | |

tais como efeito nutricional e estresse relacionado ao grande número de leitões do primeiro parto.

Outra fonte de variação utilizada em todas as análises foi o grupo contemporâneo (GC), o qual agrupa os animais por sexo, mês/ano de nascimento, prédio de testes para GMD e ET (onde o manejo a que foi submetido o animal é considerado) e prédio de nascimento (onde as características de alojamento são consideradas).

Portanto, características com herdabilidade média a alta deveriam sofrer nenhuma ou pouca influência dos GC, o que pode não acontecer devido à restrição no tamanho da amostra.

Pode-se observar que o ganho de peso médio diário (GMD) do animal têm influência sobre o genótipo da raça Landrace ($p < 0.0135$) (Tabela 2). O genótipo AA apresentou uma média maior (1.03 Kg) em relação aos genótipos AB (0.90 Kg) e BB (0.91Kg). A espessura de toucinho não é influenciada pelo genótipo.

As raças Landrace e Large White foram analisadas quanto ao número de leitões nascidos vivos no primeiro parto e não demonstraram influência significativa quanto ao genótipo. A raça Pietrain não foi analisada devido ao número de indivíduos insuficiente para a análise.

As análises para as características de DEPGMD (diferença esperada na progênie de ganho de peso médio diário) na raça Landrace esta sendo

influenciada pelo genótipo RPRL ($p < 0.0610$), onde os animais homozigotos AA apresentaram média maior (67,7 g) que os de genótipos AB (48,9 g) e os de genótipos BB (56,4 g), Tabela 2.

Conclusões

As análises estatísticas mostraram que o genótipo RPRL teve efeito sobre peso médio diário na raça Landrace ($p < 0,0135$), onde os animais de genótipo AA (1,03 Kg) apresentaram maior GMD em relação ao animais heterozigoto AB (0,90 Kg) e aos animais homozigoto BB (0,91 Kg).

As médias de DEPGMD na raça Landrace também foram diferentes em relação ao genótipo ($p < 0,0610$), confirmando a análise dos dados reais de Ganho de Peso Médio Diário, para animais do genótipo AA (67,70 g) é esperada uma DEP maior que aquela esperada para animais do genótipo AB (49,98 g) e aqueles de genótipo BB (56,4 g).

Métodos de seleção assistida por marcadores, juntamente com métodos de seleção tradicional poderão ser utilizados para potencializar e acelerar o melhoramento de características de interesse econômico em suínos, onde o gene do receptor de prolactina (RPRL) poderá ser utilizado como um marcador molecular para o ganho de peso médio diário real e sua DEP.

Summary

The productivity and quality increase of the animal products is coming to be of big economic interest. The prolactin (PRL) is an essential hormone for the reproductive success and its receptor (PRLR) has been detected in several tissues (Kelly et al., 1991). The PRLR gene has been recently mapped to pig chromosome 16 (Vincent et al., 1997). This research was aimed at analyzing the PRLR genotypical frequency in three different swine races, Landrace, Large White and Pietrain and correlate the genotypes with characteristics of economic interest. It was analyzed 124 animals.

Key-words

Prolactin.
Receptor.
Gene.
Pig.

The DNA was extracted from the pig blood and submitted to PCR-RFLP technique, to the genotypes determination of the prolactin receptor gene. The statistics analysis showed that the PRLR genotypes had an effect on the daily average weight of the Landrace race ($p < 0,0135$). The averages of EDP (Expected Difference of Progeny) in daily average weight of the Landrace race were also different in relation to the genotypes ($p < 0,0610$), confirming the real data analysis of daily average weight increase. Attended selection methods by markers, together with traditional selection methods can be used to increase and accelerate the improvement of economic interest characteristics in pigs, while the prolactin receptor gene (PRLR) can be used as a molecular marker for the real daily average weight increase and its EDP.

Referências

- 1- KELLY, P. A.; BOUTIN, J. M.; JOLICOEUR, C.; OKAMURA, H.; SHIROTA, M.; EDERY, M.; DUSANTER-FOUR, I.; DJIANE, J. Purification, cloning, and expression of the prolactin receptor. **Biol Reprod.**, v. 40, n. 1, p. 27-32, 1989.
- 2- VICENT, A.; WANG, L.; TUGGLE, C. K.; ROBIC, A.; ROTHSCHILD, M. F. Prolactin receptor maps to pig chromosome 16. **Mammalian Genome**, v. 8, p. 793-794, 1997.
- 3- SHIBELI, V.; ROKKONES, E.; GAUTYIK, K. M. Growth Homone and prolactin receptors belong to a new receptor family. Biological and Medical Aspects. 1993. **Tidsskr Nor Laegeforen**, v. 113, n. 6, p. 725-730. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em: 9 mar. 2000.
- 4- SAKAI, S.; KATOH, M.; BERTHON, P.; KELLY, P. A. Characterization of prolactin receptors in pig mammary gland. **Biochem J.**, v. 224, n. 3, p. 911-922, 1984.
- 5- BORGES, M. **Marcadores moleculares e seus efeitos sobre características quantitativas de bovino de corte**, 1997. 119 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 1997.
- 6- ROTHSCHILD, M.; JACOBSON, C.; VASKE, D.; JTUGGLE, C.; WANG, L.; SHORT, T.; ECKARDT, G.; SASAKI, S.; VINCENT, A.; MCLAREN, D.; SOUTHWOOD, O.; VAN DER STEEN, H.; MILEHAM, A. e PLASTOW, G. The estrogen receptor locus is associated with a major gene influencing litter size in pigs. **National Academy Sciences**, v. 93, n. 1, p. 201-205, 1996