

Hepp *et al.* (2012)

- Tradução do conteúdo principal, sem incluir Figuras, Tabelas e Referências Bibliográficas, efetuada pelo autor sênior;

Identificação do alelo *e* do locus Extensão (MC1R) na Ovelha Crioula Brasileira e seu papel na variação da cor da lã.

D. Hepp¹, G.L. Gonçalves¹, G.R.P. Moreira², T.R.O. Freitas¹, C.T.D.C. Martins³, T.A. Weimer³ and D.T. Passos³

¹Departamento de Genética, Instituto de Biociências,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

²Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

³Hospital Veterinário, Universidade Luterana do Brasil, Canoas, RS, Brasil

Autor correspondente: G.R.P. Moreira

E-mail: gilson.moreira@ufrgs.br

Genetics and Molecular Research (2012) **Ahead of Print**

Recebido em 7 de outubro, 2011

Aceito em 8 de maio, 2012

Publicado em 22 de maio, 2012

DOI <http://dx.doi.org/10.4238/2012.May.22.5>

Resumo

O gene do receptor 1 da melanocortina (MC1R) tem sido descrito como responsável pela coloração preta em algumas raças de ovinos, porém, pouco é conhecido sobre sua função em muitas raças coloridas, particularmente naquelas com grande variedade de fenótipos de coloração. A Ovelha Crioula Brasileira é uma raça local do sul do Brasil que apresenta uma ampla variedade de cores na lã. Nós examinamos o gene MC1R (*locus* Extensão) com vistas a identificar a presença do alelo *e*, bem como determinar seu papel no controle na variação da coloração da lã nessa raça. Cento e vinte e cinco animais, abrangendo os fenótipos mais comuns na Ovelha Crioula (preto, marrom, cinza escuro, cinza claro e branco), foram seqüenciados para detectar as mutações p.M73K e p.D121N. Além destas duas mutações, outros três sítios sinônimos (429, 600 a 725) foram encontrados. O alelo dominante (E^D : p.73K e p.121N) foi encontrado somente em animais coloridos, enquanto o alelo recessivo (E^+ : p.73M e p.121D) apresentou-se em homozigose somente em animais brancos. Nós concluímos que o MC1R está envolvido no controle da coloração da lã na Ovelha Crioula, particularmente no fenótipo escuro, embora um segundo gene possa estar envolvido na expressão do fenótipo branco nesta raça.

Palavras-chave: genética da coloração; receptores de melanina; ovinos nativos; Sul do Brasil.

INTRODUÇÃO

A coloração da pelagem é uma característica notável em mamíferos, particularmente em espécies domésticas nas quais freqüentemente é um atributo para o reconhecimento das raças. A coloração da pelagem apresenta aplicações práticas para a produção de fibras em ovinos, cabras e outras espécies na pecuária (Fontanesi *et al.*, 2010). Globalmente, a variabilidade desta é devida à

presença, distribuição e atividade dos melanócitos, os quais produzem dois tipos de pigmentos, eumelanina e feomelanina, resultando em colorações pretas/marrons e vermelhas/amarelas, respectivamente (Searle, 1968).

Um grande número de genes que afetam a coloração foram descritos no camundongo de laboratório (*Mus*), uma espécie modelo para estudos de pigmentação (Bennett & Lamoreux, 2003). Dois *loci* em particular (Agouti e Extensão) possuem um papel principal na determinação da cor da pelagem, através do controle e regulação das quantidades relativas de eumelanina e feomelanina na pele e pêlos (Searle, 1968). O locus Agouti codifica a proteína sinalizadora agouti (ASIP; Bultman *et al.*, 1992), uma pequena molécula sinalizadora parácrina que interage com o produto do locus Extensão. Este locus codifica para o receptor 1 da melanocortina (MC1R) uma proteína de sete domínios trans-membrana acoplada à proteína G, envolvida no controle da troca da síntese de feomelanina por eumelanina nos melanócitos. Variações moleculares no MC1R têm sido associadas com alterações na pigmentação em muitas espécies de mamíferos domésticos, incluindo camundongos (Robbins *et al.*, 1993), bovinos (Klungland *et al.*, 1995; Rouzaud *et al.*, 2000), cavalos (Marklund *et al.*, 1996), cabras (Fontanesi *et al.*, 2009), coelhos (Fontanesi *et al.*, 2006), suínos (Kijas *et al.*, 1998, 2001) e ovinos (Våge *et al.*, 2003; Calvo *et al.*, 2006; Royo *et al.*, 2008; Fontanesi *et al.*, 2010). Recentemente, entretanto, Gonçalves *et al.* (2012) questionaram a importância deste gene na determinação da expressiva variação existente na coloração de uma linhagem de roedores.

Particularmente em ovinos, estudos prévios identificaram dois alelos no locus Extensão: o alelo dominante preto (E^D) que causa a pigmentação preta em raças coloridas; e o alelo selvagem (E^+) que é largamente distribuído na maioria das raças e cuja segregação acompanhada do locus Agouti é responsável pela maior parte da variação na coloração (Searle, 1968; Sponenberg, 1997). Em contraste aos camundongos, o alelo recessivo *e* para o locus Extensão não foi ainda claramente documentado em ovinos (Fontanesi *et al.*, 2010). Entretanto, seu papel na determinação dos fenótipos preto e branco em espécies domésticas tem recebido muita atenção nos últimos 10 anos. Vage *et al.* (1999) investigaram o gene MC1R e descreveram duas mutações específicas (p.M73K e p.D121N) que ativam constitutivamente o alelo dominante, caracterizado como o alelo extensão preto (E^D), na raça Norwegian Dala, resultando no fenótipo preto. Adicionalmente, Norris & Whan (2008) recentemente caracterizaram o gene ASIP e identificaram uma duplicação em tandem de 190-kb subjacente à coloração branca do alelo dominante branco (A^{Wt}). Em adição, uma deleção de 5 nucleotídeos localizada no exon 2 do gene, uma substituição de um aminoácido no exon 4, bem como uma mutação regulatória foram associadas com o alelo recessivo preto não-agouti (A^a – Gratten *et al.*, 2010; Norris & Whan, 2008; Royo *et al.*, 2008). A ocorrência de ambos alelos A^a (ASIP) e E^D (MC1R) foi proposta em raças com fenótipos pretos (Roberts & White, 1930) e foi demonstrada especificamente na raça ovina Masesse (Fontanesi *et al.*, 2011).

Entretanto, em poucas raças de ovinos coloridos, tais como Aragonesa, Salz, Norwegian Pelt, Nanping black-boned, Omney Marsh black boned e Xalda, o alelo dominante do MC1R que resulta no fenótipo preto não foi encontrado (Våge *et al.*, 2003; Royo *et al.*, 2008; Deng *et al.*, 2009). Além disso, a presença deste não foi investigada em diversas raças nas quais uma ampla diversidade de colorações na lã pode ser encontrada além dos fenótipos totalmente preto e branco, como por exemplo na Crioula. Esta raça ovina nativa é oficialmente reconhecida no Brasil, sendo descendente dos primeiros animais trazidos à América do Sul pelos colonizadores europeus no século XVII (Henkes *et al.*, 1993; Vaz, 2000). As ovelhas Crioulas foram introduzidas no Rio Grande do Sul, o estado mais ao sul do Brasil, onde foram criadas continuamente por quatro séculos. Os rebanhos existentes apresentam uma extraordinária variedade de cores na lã variando do preto ao branco, incluindo diversas matizes de cinza e marrom (Gonçalves *et al.*, 2010; Moreira, GRP, resultados não publicados). Apesar desta diversidade notável, não existem informações sobre a herança destas cores e os mecanismos genéticos envolvidos na regulação da pigmentação de lã nestes animais. Portanto, neste estudo, nós caracterizamos a região codificante do gene MC1R em diferentes fenótipos de pigmentação na Ovelha Crioula a fim de investigar a presença dos alelos do

locus Extensão. Nós também inferimos o suposto papel de outras substituições neste gene controlador da pigmentação da lã nesta raça fenotipicamente diversa.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais e amostras

Um total de 125 amostras de sangue foram coletadas de animais adultos de cinco rebanhos puros pertencentes a membros da Associação Brasileira de Criadores de Ovinos Crioulos (ABCOC) e sob registro genealógico na ARCO (Associação Brasileira de Criadores de Ovinos): Buriti (N= 45), Esmeralda (N= 11), Harmonia (N= 9), Santa Fé (N= 55) e Sobrado Branco (N= 5). A cor da lã foi avaliada a partir de fotografia digitais tiradas da visão dorsal com uma câmera Sony® Cyber-shot DSC-H10 e classificada utilizando a tabela de cores RGB (Walsh KJ, 2007, Cópia em <http://web.njit.edu/~walsh/rgb.html>). Os espécimes analisados abrangeram os cinco fenótipos principais descritos na Ovelha Crioula: preto (de black a gray 10), marrom (de tan 02 a tan 04), cinza escuro (de gray 40 a gray 60), cinza claro (de gray 70 a gray 80) e branco (figura 1). Para a realização das análises estatísticas estas foram categorizadas em duas classes: Coloridos e Brancos. Indivíduos Coloridos foram subdivididos em duas classes: Pretos e Coloridos não-pretos, os últimos sendo então subdivididos em Marrom, Cinza escuro e Cinza claro.

Extração de DNA e sequenciamento

O DNA genômico foi isolado de acordo com os procedimentos descritos por Miller *et al.* (1988). A região codificante inteira (954 pb) e uma pequena porção das regiões flangeadoras do MC1R foram sequenciadas em 74 indivíduos, incluindo todos os fenótipos de coloração a fim de confirmar a presença dos polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs) e investigar outras substituições potencialmente envolvidas na diversidade de cores e a variação na região não transcrita do MC1R. Os primers para a amplificação e sequenciamento do MC1R (tabela 1) foram obtidos de Våge *et al.* (1999). O PCR foi realizado utilizando o equipamento termociclador PT-100 (MJ Research, USA) em um volume de 20 µL contendo de 10 a 100 ng de DNA alvo, 1 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), 1X PCR buffer, 2,5 mM dNTPs, 10 pmol de cada primer e concentração otimizada de MgCl₂ (de 1,0 a 2,0 mM). As condições de PCR foram as seguintes: 5 minutos a 95°C; 35 ciclos de amplificação de 30 segundos a 95°C, 30 s da temperatura de anelamento apropriada (tabela 1), 30 s a 72°C e 5 minutos a 72°C. Para o sequenciamento do fragmento do MC1R, 3 a 5 µL do produto do PCR foram tratados com 2 µL de ExoSAP (USB Corporation, USA) conforme o protocolo do fabricante. As reações de sequenciamento dos produtos de PCR foram realizadas utilizando o kit Big Dye v3.1 (Applied Biosystems, USA). As reações de sequenciamento foram carregadas em um sequenciador ABI3730XL (Applied Biosystems, USA) após os passos de purificação realizados com 73,5 µL de etanol 70% e 1,5 µL de MgCl₂ 50 mM. Todas as sequências foram inspecionadas visualmente, editadas, reunidas e alinhadas utilizando o software CodonCode Aligner. A nomenclatura dos polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs) detectados foi obtida seguindo a nomenclatura para a descrição de variações (cópia em <http://www.hgvs.org/mutnomen/>). As sequências foram depositadas no banco de dados do GenBank, com os números de acesso JF279452 a JF279466.

Genotipagem

Através de PCR-RFLP foram determinados os genótipos para as duas mutações não-sinônimas c.218T>A, p.M73K e c.361G>A, p.D121N, as quais constituem o alelo E^D, em todas as amostras de ovinos Crioulos. A amplificação por PCR foi realizada utilizando pares de primers para fragmentos da sequência do gene MC1R (tabela 1). A reação de amplificação foi composta de 1,5 mM de MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada primer, 50 a 80 ng de DNA genômico e 0,5 U de *Taq* DNA polimerase em um volume final de 25 µL. As condições de amplificação foram 94°C por 3 minutos e 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, a temperatura de anelamento adequada entre 59 e 65°C (tabela 1) por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, com uma etapa de extensão final de 72°C

por 5 minutos. O produto do PCR dos primers E3F/E6R e E3F/E8R (5 μ L) foram digeridos em um volume de reação de 20 μ L contendo tampão de reação 1X e 5 U das enzimas *NlaIII* e *MseI*, respectivamente. O produto destas reações foi avaliado por eletroforese em gel de poliacrilamida:bisacrilamida 29:1 em TBE 1X. Os fragmentos de DNA foram visualizados por coloração com nitrato de prata. O alelo c.218A foi caracterizado por quatro fragmentos de DNA (145 + 90 + 48 + 27 pb), enquanto o alelo c.218T é consistido de cinco fragmentos (118 + 90 + 48 + 27 + 17 pb). A análise da mutação c.361G>A foi obtida pela digestão do fragmento de 754 pb do gene MC1R e o padrão resultante foi caracterizado por um fragmento de 754 pb (alelo c.361G) ou dois fragmentos de 496 + 258 pb (alelo c.361A).

Análise dos dados

Os resultados do seqüenciamento foram utilizados para gerar haplótipos incluindo os SNPs previamente identificados dentro do gene MC1R ovino, inferidos utilizando o software DnaSP v5 (Librado & Rozas, 2009). Foram calculadas a diversidade haplotípica total e nucleotídica, bem como a frequência haplotípica em cada fenótipo. O equilíbrio de Hardy-Weinberg para as frequências alélicas foi avaliado pelo teste de qui-quadrado utilizando o programa MAXLIK (Reed & Shull, 1968). A associação entre as frequências alélicas/genotípicas e a coloração da lã foi avaliada pelo teste qui-quadrado (alfa = 0,05), utilizando o software SPSS ® v10.0.5.

RESULTADOS

Caracterização da sequência do MC1R

O seqüenciamento de 1045 pb do gene MC1R (incluindo a região codificante inteira de 954 pb, 35 pb do 5'-UTR e 58 pb do 3'-UTR) em Ovinos Crioulos com diferentes cores na lã revelou 5 SNPs, incluindo o alelo *e* previamente observado no locus Extensão (figura 2). A maior parte dos fenótipos coloridos apresentaram as substituições c.218T>A e c.361G>A, causadoras das mudanças de aminoácidos p.M73K e p.D121N do alelo E^D. Entretanto, os indivíduos brancos apresentaram apenas o alelo selvagem (E⁺; figura 3). Os outros três polimorfismos (c.429C>T; c.600T>G; c.735C>T) são substituições sinônimas. Estes três SNPs e as duas mutações não-sinônimas do alelo E^D identificadas resultaram em sete haplótipos (tabela 2). O haplótipo 1 (H1) representa a sequência selvagem do MC1R, e foi observado em fenótipos brancos e pretos. O haplótipo 2 (H2) difere de H1 pela presença dos alelos c.218A, c.361A e c.429C, e ocorreu em indivíduos pretos e marrons. O haplótipo 3 (H3) difere de H2 em quatro sítios polimórficos (c.218, c.361, c.429 e c.600) e foi observado em fenótipos marrons e cinza claros. O haplótipo 4 (H4) difere de H3 pelas duas substituições não-sinônimas do alelo E^D e pelos três sítios sinônimos, e estava presente em todos os fenótipos com exceção do branco, representando o haplótipo mutante. O haplótipo 5 (H5) difere de H3 somente pelo alelo G no sítio c.429, e ocorreu somente em fenótipos marrons. O haplótipo 6 (H6) difere de H2 somente em três nucleotídeos (218, 361 e 735), e foi encontrado somente em indivíduos pretos. Por fim, o haplótipo 7 (H7) difere dos demais em pelo menos dois sítios, os quais foram observados em heterozigose e estava presente somente em fenótipos pretos e cinzas. A diversidade haplotípica foi 0,85 +- 0,05 (=média +- erro padrão) e a diversidade nucleotídica foi de 0,002. Não foram observadas diferenças nos pequenos segmentos das regiões 5' e 3'-UTR seqüenciados.

Frequências alélicas e genotípicas associadas com coloração da lã.

As frequências alélicas estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg nos grupos Preto ($\chi^2=0,778$; g.l.=1; P= 0,378), Coloridos não-pretos ($\chi^2= 3,29$; g.l.= 1; P=0,070) e nos Coloridos (Pretos + Coloridos não-pretos; $\chi^2= 3,19$; g.l.= 1; P= 0,075). As frequências alélicas variaram entre indivíduos Brancos, Pretos e Coloridos não-pretos ($\chi^2= 65,26$; g.l.= 4; P<0,001; figure 3A). Os valores absolutos dos resíduos correspondentes foram 8,04, 2,54 e 3,98, para Brancos, Pretos e Coloridos não-pretos, respectivamente. Assim, a frequência do alelo E⁺ (igual a 100%) foi significativamente maior dentro do grupo Branco e a do alelo E^D nos grupos dos animais Pretos e

Coloridos não-pretos. A frequência genotípica variou significativamente entre os grupos Branco e Coloridos ($\chi^2 = 86,42$; g.l.= 4; $P < 0,001$; figura 3B). Valores absolutos dos resíduos correspondentes foram 9,30 para o genótipo E^+/E^+ em indivíduos Brancos, 4,26 para E^D/E^+ e 3,60 para E^D/E^D nos Coloridos. Desta forma, a frequência do genótipo E^+/E^+ (igual a 100%) foi significativamente maior dentro do grupo Branco e as dos genótipos E^+/E^D e E^D/E^D nos Coloridos. Não houve diferença na frequência genotípica entre os subgrupos Preto, Cinza claro, Cinza escuro e Marrom ($\chi^2 = 6,38$; g.l.= 6; $P = 0,382$; representado no retângulo vermelho na figura 3B).

DISCUSSÃO

Estudos prévios identificaram dois alelos no locus Extensão em ovinos: E^D e E^+ (Searle, 1968; Sponenberg, 1997). O alelo E^D que foi posteriormente caracterizado no nível molecular (Våge *et al.*, 1999), está diretamente envolvido na pigmentação em ovinos (Lundie, 2004). Nossos dados indicam que este alelo é claramente responsável pela variação na coloração da lã na Ovelha Crioula, particularmente determinando os fenótipos escuros. Os resultados das frequências genotípicas suportam a influência do MC1R; todos os indivíduos brancos foram homozigotos para o alelo E^+ e somente indivíduos coloridos apresentaram o alelo dominante E^D , sugerindo que este inibe a expressão do fenótipo branco. Alguns indivíduos coloridos não possuíam o alelo E^D e não foram encontradas outras mutações não-sinônimas no MC1R. Juntos, estes resultados indicam que outros genes também devem estar envolvidos no controle da coloração nesta raça. Nós encontramos cinco SNPs e sete haplótipos na sequência do MC1R nos Ovinos Crioulos. Todos estes SNPs foram identificados em outras raças (tabela 3). Na sua maior parte estes foram demonstrados em raças européias e asiáticas com uma variação na cor da lã relativamente estreita. Este é o primeiro estudo destes SNPs em uma raça ovina nativa da América do Sul com uma ampla variedade na coloração da pelagem. Nossa identificação de diferentes sítios polimórficos, com altas diversidades haplotípicas e nucleotídicas em uma raça nativa aumenta o conhecimento da variação do locus MC1R ovino.

A Ovelha Crioula foi originada a partir dos rebanhos trazidos para a América do Sul no século XVII (Henkes *et al.*, 1993; Vaz, 2000) e, diferente de outras raças, não foi selecionada para uma cor específica. A diversidade de cores observada nesta raça pode ser o resultado da ação de diferentes genes envolvidos na síntese e/ou transporte de melanina, tais como ASIP, TYRP1 e OCT, os quais não foram ainda testados. As diferenças observadas aqui entre homozigotos E^+ brancos e coloridos pode ser devida à presença do alelo dominante branco do gene ASIP (A^{Wt}) nos indivíduos brancos, enquanto os coloridos seriam homozigotos para um alelo recessivo do ASIP (tanto A^a ou outro alelo ASIP), o que deve ser explorado posteriormente. Os genes MC1R e ASIP apresentam interações epistáticas. O alelo dominante E^D do MC1R geralmente inibe a expressão dos alelos de ASIP. Assim, somente em indivíduos homozigotos E^+ a expressão dos diferentes alelos do ASIP será observada (Voisey & Van Daal, 2002).

Duas variedades principais - Fronteira e Serrana, foram reconhecidas na Ovelha Crioula. Notáveis características morfológicas, em adição à pigmentação, diferenciam estas duas variedades. O tamanho do corpo da Serrana é maior, e é coberto com fibras pretas e mais curtas (Vaz, 2000). A Fronteira é menor e apresenta uma ampla variedade de fenótipos de pigmentação (cinza claro e escuro, marrom e branco), bem como fibras mais longas. Gonçalves *et al.* (2010) demonstraram, com base em marcadores microssatélites e mitocondriais, que estas variedades são geneticamente diferentes, e sugeriram que a cor preta pode ter sido fixada no tipo Serrano. Outro aspecto particular na coloração dos Ovinos Crioulos é a variação contínua no padrão de coloração, incluindo diversos tons de fenótipos cinzas e pálidos encontrados na variedade Fronteira. Em bovinos, diversas raças portando o alelo e apresentam uma ampla variedade de tons avermelhados/pálidos (de marrom a branco; Klunghland *et al.*, 1995; Rouzaud *et al.*, 2000; Maudet & Taberlet, 2002; Russo *et al.*, 2007). O alelo A^{Wt} tem sido sugerido como determinante, pelo menos em parte, do fenótipo branco na coloração da pelagem (Sponenberg, 1997). A base molecular do alelo A^{Wt} foi recentemente

determinada por Norris & Whan (2008), que identificaram uma variação de número de cópias afetando os genes ASIP, AHCY e ITCH. Entretanto, parece evidente que outros loci (por exemplo KIT) estão envolvidos na determinação do fenótipo branco em ovinos (Renieri et al. 2008).

Nossos resultados são importantes também para a perspectiva da genética da conservação devido aos dois principais aspectos das práticas atuais de manejo das variedades da Ovelha Crioula. Primeiramente, inter cruzamentos entre os tipos Fronteira e Serrana são uma prática corrente. Por meio destes, os criadores pretendem concomitantemente aumentar os tamanhos do corpo e das fibras de suas ovelhas. Em outras palavras, eles esperam combinar em um único rebanho o corpo de maior tamanho da Fronteira e o tamanho da fibra maior da Fronteira, assim aumentando tanto a produção de carne como de lã. Nós demonstramos que a cor preta é fortemente influenciada pelo alelo dominante do MC1R. Assim, ao utilizar carneiros deste tipo em um rebanho Fronteira, a maior parte da prole provavelmente será preta e possivelmente maiores, reduzindo a frequência de ovelhas brancas, tradicionalmente relacionadas à variedade Fronteira da Ovelha Crioula. Como consequência, nós predizemos que as características da Fronteira, cujos rebanhos são naturalmente menores em número (Vaz, 2000) e menos diversos geneticamente (Gonçalves *et al.*, 2010), podem ser assim progressivamente absorvidos.

Em resumo, nossos dados demonstram a influência do gene MC1R no controle da coloração da lã em Ovinos Crioulos, particularmente em relação ao fenótipo preto, e que pelo menos um segundo locus está envolvido na produção do fenótipo branco segregante nesta raça. Juntos, estes resultados tem uma relação direta com os esforços de conservação para preservar sua diversidade de cores. Nós enfatizamos que a excepcional diversidade de cores da lã dentro dos Ovinos Crioulos ressalta a necessidade de preservar este recurso pecuário como existe atualmente, pela manutenção de cruzamentos aleatórios que tem agido nesta raça nativa nos últimos 400 anos.

AGRADECIMENTOS

Pesquisa realizada com o suporte do CNPq em relação à T.R.O. Freitas, G.L. Gonçalves, G.R.P. Moreira e T.A. Weimer. Os autores agradecem os membros da ABCOC (Associação Brasileira de Criadores de Ovinos Crioulos) pelo fornecimento de amostras de seus rebanhos. Denis S. Silva (UFRGS) auxiliou na edição das Figuras. Também, a Sidia M. Callegaris-Jacques (UFRGS) pelo suporte nas análises estatísticas. A versão do texto em inglês foi editada por Janet W. Reid.