ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD DEL GEN DE LA OXITOCINA OVINA EN LA RAZA CHURRA*

J.A. Morán, J.J. Arranz y F. San Primitivo.
Dpto. Producción Animal I, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, Campus de Vegazana s/n, 24071 León

INTRODUCCIÓN

La identificación de los genes que influyen sobre los caracteres cuantitativos de interés en producción animal (QTLs), suele ser abordada utilizando los mapas de ligamiento. Estos mapas se construyen mediante la información que suministran marcadores genéticos anónimos, principalmente secuencias microsatélite, que cubren, desde un cromosoma determinado al genoma completo. La segregación de los marcadores se estudia en pedigríes complejos, compuestos por diferentes estructuras familiares. Este proceso ha demostrado su eficacia en diversas especies (Georges et al., 1995, Spelman et al., 1996; Coppietters et al., 1998; Walling et al., 2000). Existe una segunda estrategia para intentar identificar estos QTLs; es la llamada hipótesis de los *genes candidatos*. Se denomina gen candidato a todo aquel que, debido a los conocimientos bioquímicos o fisiológicos sobre su acción, puede estar implicado en la expresión o la fisiología de un carácter determinado. Estos loci pueden ser genes estructurales o reguladores, e incluso pueden afectar a la cadena bioquímica de síntesis o degradación de sustratos relacionados con la expresión del carácter (Lynch y Walsh, 1998).

La hipótesis planteada propone que una proporción significativa de la varianza genética, de un carácter determinado, se debe a la segregación de diferentes alelos (funcionales o reguladores) de los genes candidatos para este carácter (Bryne y McMullen, 1996). La estrategia "Gen candidato" ha resultado muy eficaz para la detección de genes que presentan un pequeño efecto (pequeña contribución a la varianza total del carácter) y en aquellas poblaciones con estructuras familiares que poseen un escaso poder estadístico en estudios de ligamiento (Ebstein et al., 1996; Gelernter y Crowe, 1997).

Uno de los genes candidatos elegidos en relación con la producción láctea, siguiendo los principios arriba mencionados, es la oxitocina. Esta hormona hipofisaria tiene un papel fundamental en el mecanismo de eyección láctea, ya que contribuye de una manera primordial al mecanismo de contracción de las células mioepiteliales (Sapyno et al., 1993). En el presente trabajo pretendemos mostrar la variabilidad encontrada en el exón II del gen de la oxitocina en el ganado ovino de raza Churra.

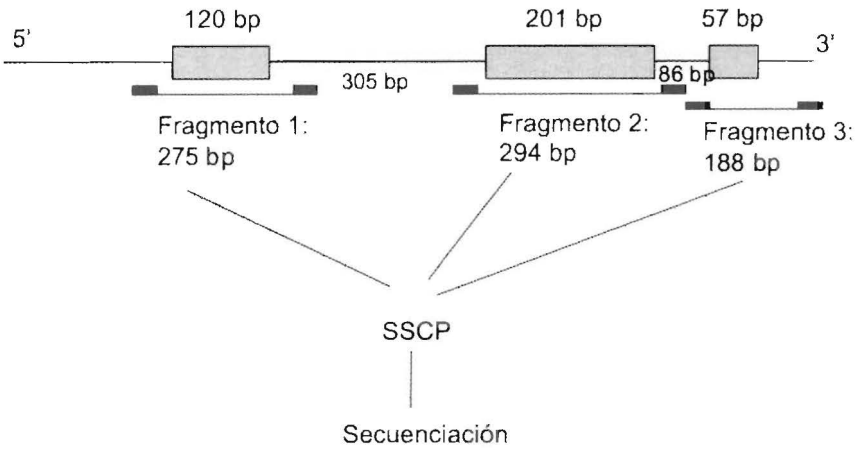
MATERIAL Y MÉTODOS

A partir de la secuencia del gen de la oxitocina ovina (Nº acceso GeneBank X55131) se han diseñado cebadores para la amplificación de fragmentos que engloben los tres exones del gen, como se muestran en la Figura 1.

Con objeto de aumentar las posibilidades de encontrar variabilidad, se ha desarrollado un panel formado por 32 animales no emparentados de la raza Churra y 8 animales de cada una de las siguientes poblaciones: Assaf, Awassi, Castellana, Lacaune, Latxa, Manchega, Merina y Milchschaf. En total 96 muestras diferentes.

* Trabajo financiado por el proyecto AGF99/0191 del MCYT

Figura 1: Esquema del procedimiento de búsqueda de variabilidad en el gen de la oxitocina



Metodología

Se diseñaron cebadores para amplificar la secuencia que contiene los tres exones del gen de la oxitocina, siguiendo como criterios: a) que las temperaturas de hibridación de la pareja de cebadores estuviesen lo más cercanas posibles y b) que el producto amplificado resultante tuviese una longitud entre 150 y 300 bp.

La PCR se llevó a cabo en termocicladores GeneAmp PCR System 9700 de Applied Biosystems, empleando los cebadores indicados en la tabla 1 y siguiendo el siguiente perfil de PCR: (94 °C - 5') 30 ciclos (94 °C - 30"; 60 °C - 40" + 72 °C - 40").

Tabla 1. Cebadores utilizados en la amplificación del exón 2 del gen de la oxitocina

Cebadores de PCR	
OXI-E2 UP: CTCCCGCCAGTGTCTCCCCT	OXI-E2 DN: TGCACAGAGAGACGCCGAG

La electroforesis se realizó en un sistema vertical, utilizando geles de 20 x 16 cm compuestos por polímeros de MDE 0,5x. La separación de los fragmentos de PCR se desarrolló a 15 W, durante 4 horas y a 6 °C.

Secuenciación

Para la secuenciación se utilizó un secuenciador "ABI Prism377" de Applied Biosystems, utilizando el kit de secuenciación BigDye terminador v3.1 Cycle Sequencing kit. Los resultados se compararon mediante la bases de datos de Internet del NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) y se alinearon mediante el programa ClustalX.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de los SSCPs produjo 9 patrones electroforéticos distintos, para el fragmento correspondiente al exón II del gen de la oxitocina. Cada patrón se corresponde con una combinación diferente de bandas de cadena simple. La sensibilidad del análisis se maximizó, de forma que cualquier ligera diferencia observada en el patrón de bandas se consideró como un nuevo patrón, que posteriormente sería verificado en el proceso de secuenciación.

Para cada uno de estos 9 modelos electroforéticos distintos, se secuenciaron tres animales utilizando los dos cebadores empleados en la PCR, con el fin de confirmar la diferente composición en nucleótidos de cada uno de los patrones de migración.

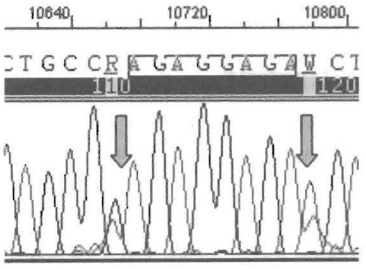
Con el fin de obtener la secuencia definitiva de cada patrón, las secuencias de los 27 animales fueron alineadas mediante el programa clutalX.
Una vez alineados, se verificaron 6 secuencias diferentes para el exón II de la oxitocina. De ellas, 4 afectaban a la región codificante. Al traducir el código proteico para cada una de las 4 variantes, pudimos comprobar que solo una de ellas producía cambios en la secuencia aminoacídica de la proteína. En concreto, se producían dos cambios, uno en el aminoácido 46 del péptido señal Arginina, **R**, por Glutamina, **Q**, y otro en la posición 49 Asparagina, **N**, por Isoleucina, **I**. El resultado de la secuenciación de este mutante se muestra en la figura 2 y la traducción de los dos tipos proteicos en la Tabla 2.

Tabla 2: Secuencia aminoacídica del péptido señal normal y mutado

Oxitocina y Neurotripsina X55131	CLPCGPGGKGRCFGPSICCGDELGCFVGTAEALRCREENYLPSPCQSGQK
Translation of OXI-E2 (direct 1)	CLPCGPGGKGRCFGPSICCGDELGCFVGTAEALRCREENYLPSPCQSGQK
Translation of OXI-E2 mutado	CLPCGPGGKGRCFGPSICCGDELGCFVGTAEALRCQEEIYLPSPCQSGQK

Los animales portadores de esta mutación eran heterocigotos, es decir poseían los dos tipos proteicos, el normal y el mutado. Aún no se ha verificado la posible influencia de este nuevo tipo proteico sobre caracteres productivos, ya que la frecuencia encontrada en la población de raza Churra ha sido muy baja, e insuficiente para realizar un estudio de asociación.

Figura 2: secuencia de los dos SNPs que producen cambios de la secuencia aminoacídica en la oxitocina



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bryne, P.F. McMullen, M.D. (1996). Defining genes for agricultural traits: QTL analysis and the candidate gene approach. Probe, 7: 24-27.

Coppieters, W., Riquet, J., Arranz, J.J., Cambisano, N., Grisart, B., Marq, F., Moreau, L., Nezer, N., Simon, P., Vanmanshoven, P., Wagenaar, D., Georges, M. (1998). A QTLwith major effect on milk yield and composition maps to bovine chromosome 14. Mammalian Genome, 9: 540-544

Ebstein, R.P., Novick, O. Umansky, R. (1996). Dopamine D4 (D4DR) exonIII polymorphism associated with the human personality trait of novelty seeking. Nature Genetics, 12: 78-80.

Gelernter, J., Crowe, R.R. (1997). Candidate genes and psychiatric genetics: tomorrow never knows. Psychiatric Annals, 27: 262-267.

Georges, M. Nielsen, D. Mackinnon, M. Mishra A. et al. (1995) Mapping quantitative trait loci controlling milk production by exploiting progeny testing. Genetics, 139: 907-920.

Lynch, M. Walsh, B. (1998). Genetics and analysis of quantitative traits. Sinauer associated Inc., Sunderland MA, USA.

Sapino, A., Macri, L., Tonda, L. Bussolati, G. (1993). Oxytocin enhances myoepithelial cell differentiation and proliferation in the mouse mammary gland. Endocrinol. 133, 838-842

Spelman, R., Coppieters, W., Karim, L., van Arendonk, J.A.M., Bovenhuis, H. (1996). Quantitative trait loci analysis for five milk production traits on chromosome six in the dutch Holstein-Friesian population. Genetics, 144: 1799-1808.

Walling, G.A., Visscher, P.M., Andersson, L., Rothschild, M.F. et al. (2000). Combined analyses of data from quantitative trait loci mapping studies. Chromosome 4 effects on porcine growth and fatness. Genetics, 155: 1369-1378.