

ASSOCIAÇÃO DOS GENES CANDIDATOS PIT-1, bGH E IGF-1 COM CARACTERÍSTICAS DE CRESCIMENTO EM UMA POPULAÇÃO F2 DE BOVINOS¹

AUTORES

Marcos Vinicius G. Barbosa da Silva², Marco Antonio Machado², Carlos Souza do Nascimento³, Antônia Kécya França Moita², Mário Luiz Martinez², Ana Lúcia Campos², Marta Fonseca Martins Guimarães²

¹ Financiado parcialmente pelo CNPq e PRODETAB

² Pesquisadores da Embrapa Gado de Leite Rua Eugênio do Nascimento, 610 – Dom Bosco – Juiz de Fora – MG, 36038-330

Tel.: (032) 3249-4700 Fax: (032) 3249-4721

E-mail:marcos@cnpqgl.embrapa.br

³ Bolsista de Apoio Técnico da FAPEMIG

RESUMO

Os hormônios do eixo somatotrófico estão envolvidos em atividades fisiológicas, como regulação do crescimento, desenvolvimento da glândula mamária e lactação. O objetivo deste trabalho foi estudar a associação dos polimorfismos dos genes bGH, IGF-1 e PIT-1 com características de peso e ganho de peso numa população F2 de bovinos (Gir x Holandês). Os polimorfismos foram analisados pela técnica de PCR-RFLP. As frequências alélicas A e B do gene PIT-1 e dos genótipos AA, AB e BB, nas populações parentais (Holandês e Gir), F1 e F2 foram semelhantes; todavia, as populações parentais apresentaram frequências alélicas e genotípicas diferentes das populações cruzadas para esse gene. Para o gene bGH, os animais da raça Holandesa apresentaram frequência igual a 100% para o alelo E e os animais da raça Gir 92% para o alelo F, resultando numa alta frequência de indivíduos heterozigotos nas populações F1 e F2. Para o gene IGF-1, todos os animais da raça Holandesa eram heterozigotos (AB) e nos animais Gir, a maioria dos indivíduos foram homozigotos (AA), implicando na alta frequência desses na F1 e F2. Foram encontradas associações significativas do alelo A do gene PIT-1 com as características de P205, P365 e GP_N_60. Para IGF-1 foi encontrado efeito significativo do alelo A somente para PN. Os alelos identificados podem ser usados como marcadores no melhoramento animal.

PALAVRAS-CHAVE

bovinos, bGH, IGF-1, marcadores moleculares, PCR-RFLP, PIT-1

TITLE

ASSOCIATION OF PIT-1, BGH AND IGF-1 GENES WITH GROWTH TRAITS IN A BOVINE F2
POPULATION¹

ABSTRACT

Somatotrophic hormones are involved with physiological activities such as growth regulation, development of mammary gland and lactation. This work aimed to study the association between polymorphisms of bGH, IGF-1 and PIT-1 genes with weight and weight gain traits in a bovine F2 population derived from Holstein x Gyr crosses. Polymorphisms were detected using PCR-RFLP technique. Allelic frequencies A and B of PIT-1 gene and AA, AB, and BB genotypes were similar between Holstein and Gyr parental populations and between F1 and F2 populations although parental populations showed allelic and genotypic frequencies different from F1 and F2 crossed populations. For the bGH gene Holstein animals showed allelic frequency of 100% for E allele while Gyr animals showed allelic frequency of 92% for F allele what resulted in a high frequency of heterozygous animals in F1 and F2 populations. For the IGF-1 gene all Holstein animals were heterozygous (AB) and most of Gyr animals were homozygous (AA) resulting in a high frequency of A allele in F1 and F2 populations. Significant associations between PIT-1 allele A with traits 205 and 365 days weight and weight gain at 60 days. For IGF-1 significant association was found between A allele and birth weight. For PIT-1 gene significant associations were found between A allele and 205 and 265 days

weight and weight gain at 60 days. The selected alleles can be used as markers in animal breeding for these traits.

KEYWORDS

molecular markers, bovine, PCR-RFLP, PIT-1, bGH, IGF-1

INTRODUÇÃO

Os genes que influenciam as características poligênicas são, de modo geral, difíceis de serem identificados. Atualmente, um grande número de genes candidatos, relacionados ao crescimento em bovinos, tem sido estudados, como é o caso daqueles que compõe o eixo somatotrófico, cujo papel é fundamental no crescimento dos animais. Mutações nos genes responsáveis por cada uma das etapas deste eixo resultam em redução de estatura e, conseqüentemente, de peso. Os distúrbios de crescimento podem ser divididos em: a) deficiência de GH associada a deficiências de outros hormônios hipofisários, como PIT-1, por alterações em fatores de transcrição envolvidos na organogênese hipofisária; b) deficiência isolada de GH; e c) insensibilidade ao GH, com níveis indetectáveis de IGF-I.

O fator de transcrição da pituitária, PIT-1, foi mapeado no cromossomo 1 dos bovinos e é um fator de regulação para a síntese do GH, prolactina e tiotropina (Oprzadek et al., 2003). O GH estimula processos anabólicos como a divisão celular, crescimento esquelético e síntese protéica, enquanto o IGF-I media muitos dos efeitos do GH e regula o crescimento e o desenvolvimento pós-natal (Grochowska et al., 2001).

O objetivo deste estudo foi verificar a existência de associações entre os genes candidatos PIT-1, bGH e IGF-1 e características relacionadas ao crescimento em uma população F2 de bovinos.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de sangue de 410 animais (quatro touros da raça Holandesa, 27 vacas da raça Gir, seis machos e 67 fêmeas F₁ Holandês:Gir, 163 machos e 143 fêmeas F₂) foram coletadas e enviadas para o Laboratório de Genética Molecular da Embrapa Gado de Leite para extração de DNA e genotipagem para os genes candidatos PIT1, bGH e IGF-1. O DNA foi extraído a partir das células brancas das amostras de sangue. As amostras de DNA foram quantificadas por espectrofotometria visando determinar a quantidade e qualidade. Os polimorfismos dos genes foram analisados pela técnica de PCR-RFLP, que envolve a síntese de um fragmento e sua posterior digestão com enzimas de restrição específicas.

As frequências dos alelos dos genes PIT-1, bGH e IGF-I para 410 animais foram calculadas por meio de contagem direta.

Os animais F2 foram criados em gaiolas individuais, recebendo quatro litros de leite por dia, além de feno, ração concentrada e água à vontade até os 56 dias. Após essa idade, foram agrupados em lotes de acordo com a idade, e recriados em piquetes de grama-estrela (*Cynodon nlemfuensis*), até a idade de 12 meses, quando eram transferidos para pastos de braquiária (*Brachiaria sp*). Os animais foram pesados ao nascimento e, depois, a cada 28 dias. Os pesos foram ajustados para idades-padrão usando fatores de ajustamento obtidos do próprio conjunto de dados.

Foram analisados 306 registros de peso ao nascimento (PN), 301 registros de peso aos 60 dias de idade (P60), 271 registros de peso aos 205 dias (P205) e 222 registros de peso aos 365 dias de idade (P365). Foram também analisados os ganhos de peso entre as idades, isto é, do nascimento aos 60 dias de idade (GP_N_60), de 60 a 205 dias (GP_60_205) e de 205 a 365 dias (GP_205_365).

Para estimar o efeito direto de cada alelo, os registros foram analisados por meio de um modelo de substituição gênica, o qual considera o efeito aditivo de um alelo dos genes PIT-1, bGH e IGF-I. Este modelo de substituição gênica estima o efeito de um alelo em particular após a remoção dos efeitos aditivos de outros alelos do animal.

Nas análises, foi utilizado o seguinte modelo

$$y = Xh + Mm + Za + ?$$

em que y = vetor de registro de pesos e ganhos de peso; X e Z = matrizes incidência relativas aos efeitos fixos e aleatórios; h , a , m e $?$ = vetores de soluções para os efeitos fixos, genético aditivo, permanente de ambiente e residual, respectivamente. Ainda, m = vetor incluindo os efeitos fixos de substituição gênica para alelos dos genes PIT-1, bGH e IGF-I representados por coeficientes de regressão e M = matriz contendo 0, 1 ou 2, representando o número de cópias de determinado alelo dos genes PIT-1, bGH e IGF-I presente em cada indivíduo.

Os efeitos de ano-estação do nascimento e sexo do animal foram assumidos como fixos e os efeitos genético aditivo e residual foram assumidos como aleatórios, tendo distribuição normal, médias iguais a zero

e variâncias σ_a^2 e σ_e^2 , respectivamente.

Todas as análises foram realizadas por meio do PROC MIXED do sistema SAS (SAS, 2000), resultando em maior flexibilidade na modelagem não somente das médias, mas também das (co)variâncias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As frequências alélicas e genotípicas dos genes estudados encontram-se na Tabela 1. Verificou-se que as frequências dos alelos A e B do loco PIT-1 e dos genótipos AA, AB e BB, nas populações parentais (Holandês e Gir) foram semelhantes, o mesmo ocorrendo entre as populações F1 e F2; todavia, as populações parentais apresentaram frequências alélicas e genotípicas diferentes das populações cruzadas para esse gene, provavelmente em função da diferente intensidade de utilização de machos e fêmeas, dado que as populações F1 e F2 foram obtidas por transferência de embriões.

O gene bGH, nos animais da raça Holandesa utilizados neste estudo, apresentou frequência igual a 100,00% do alelo E e, conseqüentemente, do genótipo EE. Por sua vez, os animais da raça Gir apresentaram 92% de alelos F nesse gene, determinando a alta frequência de indivíduos heterozigotos nas populações F1 e F2. A predominância do alelo F em zebuínos, possivelmente é uma característica dos animais *Bos indicus* (Unanian et al., 2000).

Em relação ao gene IGF-I, observou-se que todos os animais da raça Holandesa foram heterozigotos (AB), ao passo que a população de animais Gir era composta, na quase totalidade, por indivíduos homozigotos para o gene A, implicando na alta frequência de indivíduos heterozigotos nas populações cruzadas. De modo geral, observou-se diferenças acentuadas nas frequências alélicas e genotípicas dos genes das populações parentais estudadas, à exceção do loco PIT-1, o que denota a existência de variabilidade entre as raças.

Os resultados da associação entre os polimorfismos dos genes candidatos estudados e as características quantitativas medidas neste estudo estão apresentados na Tabela 2. Conforme pode ser observado, para o PN, somente houve efeito significativo do alelo A do IGF-I. O IGF-I atua como mediador de muitos dos efeitos de bGH no crescimento e, provavelmente, o alelo A possa estar relacionado ao maior estímulo de processos anabólicos pré-natais, como divisão celular, crescimento esquelético e síntese protéica. Os efeitos do GH, mediados pelo IGF-I, sobre o crescimento dos tecidos musculares e esqueléticos são semelhantes aos da insulina, enquanto que o efeito direto do GH sobre o metabolismo de carboidratos e lipólise é antagônico ao da insulina, sendo sinérgico com o cortisol nas ações lipolítica e diabetogênica. O IGF-I é o agente mediador da maioria, se não de todos, dos efeitos do hormônio de crescimento no desenvolvimento muscular (Coutinho et al., 1999).

O P60 e o GP_N_60 foram influenciados significativamente pelo alelo E do bGH (Tabela 2). Possivelmente, a influência do GH sobre a regulação do crescimento e no desenvolvimento dos diferentes tecidos explique essa associação. Este resultado é conflitante ao encontrado por Unanian et al. (2000), que não encontraram associações significativas entre o polimorfismo do bGH/HAE III e ganhos de peso em diversas idades de animais da raça Nelore. Segundo esses autores, esse polimorfismo tem sido associado à qualidade de carcaça (porcentagem de ácidos graxos) e que a ausência de associação verificada pode ter sido em razão do tamanho da amostra estudada.

Foram encontradas associações significativas do alelo A do loco PIT-1 com P205, P365 e GP_N_60. Estudos bioquímicos têm revelado que PIT-1 é um fator de transcrição célula-específico crítico para a ativação da expressão da prolactina, do GH e do gene do hormônio estimulante da tireóide. Esse mesmo gene está associado à ativação de outros hormônios, como o receptor de GH, que media as ações do GH nas células alvo por meio da tradução de sinais miogênicos-estimulantes através da membrana celular. A inibição da síntese de PIT-1 leva à acentuada diminuição da expressão da prolactina e de GH, e mutações nesse gene são responsáveis pelo nanismo em algumas espécies. A influência da PIT-1 nessas características possivelmente ocorreu em razão da associação entre esse gene e o desenvolvimento corporal.

Os resultados aqui apresentados indicam que os três locos estudados podem ser utilizados como marcadores para precocidade; todavia, deve-se considerar, também, que os animais dessa população foram criados sob sistema de alimentação com restrição alimentar, tanto na fase de cria, quanto na recria, o que pode ter impedido a expressão do potencial dos animais de maior exigência. Ressalte-se que os animais utilizados neste estudo são oriundos de raças exploradas para produção de leite e em raças selecionadas para maior produção de carne, o efeito dos genes estudados poderia ser maior, em razão dos objetivos de seleção.

Um ponto importante neste tipo de estudo, segundo Brunsch et al. (2002), é que a detecção do efeito

direto de genes candidatos, em uma população experimental composta por indivíduos F2, deve ser posteriormente validada em raças ou linhagens comerciais.

CONCLUSÕES

Essas análises preliminares indicaram que o gene PIT-1 está associado a maiores ganhos de peso em sistemas com restrição alimentar enquanto o gene IGF-1 pode ser usado como critério de seleção para a obtenção de menor peso ao nascimento, sem impacto no peso à desmama e ao sobreano. O bGH teve efeito inconsistente, que desaparece após 60 dias de idade. Todavia, os resultados devem ser validados em populações contendo maior número de animais e também em raças comerciais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRUNSCH, C.; STERNSTEIN, I.; REINECKE, P. et al. 2002. Analysis of association of PIT1 genotypes with growth, meat quality and carcass composition traits in pigs. *J. Appl. Genet.*, v. 43, n. 1, p. 85-91.
2. COUTINHO, L.L., GABRIEL, J.E., ALVARES, L.E. 1999. Controle molecular do desenvolvimento da musculatura esquelética. In: Simpósio Internacional de Genética e Melhoramento Animal. Anais. UFV, Viçosa, MG. p.355
3. GROCHOWSKA, R.; LUNDÉN, A. ; ZWIERZCHOWSKI, L.; et al. 2001. Association between gene polymorphism of growth hormone and carcass traits in dairy bulls. *Anim. Sci.*, v. 72, n. 1, p. 441-447.
4. OPRZADEK, J.; FLISIKOWSKI, K.; ZWIERCHOWSKI, L.; et al. 2003.. [Polymorphisms at loci of leptin (LEP), Pit1 and STAT5A and their association with growth, feed conversion and carcass quality in Black-and-White bulls. *Anim. Sci. Papers Report*, v.21, n. 3, p. 135-145.
5. SAS. *SAS User's guide: Basic and Statistics*. SAS® INST. INC., Cary, NC, 2000.
6. UNANIAN, M;M.; BARRETO, C.C.; FREITAS, A.R.; et al. 2000. [Associação do polimorfismo do gene do hormônio do crescimento com a característica peso em bovinos da raça Nelore. *Rev. Bras. Zoot.*, v. 29, n.5, p. 1380-1386.

41ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia

19 de Julho a 22 de Julho de 2004 - Campo Grande, MS

Tabela 1 – Freqüências alélicas e genotípicas dos locos PIT-1, bGH e IGF-I, observadas em 410 animais, de acordo com o grupo genético.

Loco	GG ¹	Freqüências alélicas (%)		Freqüências genotípicas (%)		
PIT-1		A	B	AA	AB	BB
	HOL	12,50	87,50	0,00	25,00	75,00
	GIR	12,96	87,04	0,00	25,93	74,07
	F ₁	7,53	92,47	1,37	12,33	86,30
	F ₂	5,33	92,67	0,00	10,70	89,30
bGH		E	F	EE	EF	FF
	HOL	100,00	0,00	100,00	0,00	0,00
	GIR	8,00	92,00	3,85	7,69	88,46
	F ₁	63,01	36,99	26,03	73,97	0,00
	F ₂	54,15	45,85	30,00	48,00	22,00
IGF-I		A	B	AA	AB	BB
	HOL	50,00	50,00	0,00	100,00	0,00
	GIR	98,15	1,85	96,30	3,70	0,00
	F ₁	56,16	43,84	12,33	87,67	0,00
	F ₂	56,81	43,84	27,42	58,19	14,38

¹ GG = grupo genético, F1= 50%Holandês:50% Gir; F2=F1xF1

Tabela 2 – Efeito de substituição dos alelos IGF-I, PIT-1 e bGH e respectivos erros-padrão ($\hat{b} \pm$ EP) para as características de peso ao nascer (PN), peso aos 60 dias (P60), peso aos 205 dias (P205), peso aos 365 dias de idade (P365) e ganhos de peso do nascimento aos 60 dias (GP_N_60)

	PN	P60	P205	P365	GP_N_60
Loco	$\hat{b} \pm$ EP	$\hat{b} \pm$ EP	$\hat{b} \pm$ EP	$\hat{b} \pm$ EP	$\hat{b} \pm$ EP
PIT-1					
Alelo A	0,026 $\pm$ 0,999	1,920 $\pm$ 1,328	6,999 $\pm$ 3,867 [†]	14,440 $\pm$ 5,847 ^{**}	0,038 $\pm$ 0,019*
bGH					
Alelo E	0,072 $\pm$ 0,404	1,089 $\pm$ 0,550*	2,408 $\pm$ 1,711	1,242 $\pm$ 2,888	0,022 $\pm$ 0,010*
IGF-I					
Alelo A	0,844 $\pm$ 0,453*	-0,094 $\pm$ 0,616	-0,209 $\pm$ 1,876	3,094 $\pm$ 3,026	-0,013 $\pm$ 0,011

[†] (P < 0,10); * (P < 0,05); ** (P < 0,01)