

Estudo do polimorfismo do gene do hormônio de crescimento em rebanhos da raça Nelore do estado da Bahia.^{1 2}

Study of the polymorphism of the gene of the hormone of growth in a Nelore breed of the state of the Bahia.^{1 2}

M. V. ANDREA³, M. V. M. GOMES⁴, C. R. MARCONDES⁵, E. L. AQUINO⁶, A. C. C. SACRAMENTO⁷, E. S. RAMOS⁸, E. A. SOUZA⁹.

¹ Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia – FAPESB

² Deptº de Genética – FMRP, Ribeirão Preto- USP, 14049-900 - Ribeirão Preto, SP.

³ Profª. Centro de Ciências Agrárias , Ambientais e Biológicas - UFRB, 44380000, Cruz das Almas Bahia, e-mail: mvander@ufba.br

⁴ Doutorando - Deptº de Genética – FMRP, Ribeirão Preto/USP, 14049-900 - Ribeirão Preto, SP, e-mail: mvmgomes@genbov.fmrp.usp.br

⁵ Embrapa Amazônia Oriental – Tv. Dr. Enéas Pinheiro s/n, 66095-780, Marco, Belém-PA. e-mail: cimarcon@cpatu.embrapa.br

⁶ Graduandos de Agronomia, Centro de Ciências Agrárias , Ambientais e Biológicas - UFRB, 44380000, Cruz das Almas Bahia, e-mail: limaquino@hotmail.com; fagpal@yahoo.com.br

⁷ Bolsista Pibic Junior- Centro de Ciências Agrárias , Ambientais e Biológicas - UFRB, 44380000, Cruz das Almas Bahia, e-mail: carolcoelho2004@hotmail.com.

⁸ Profª. Deptº de Genética - FMRP Ribeirão Preto/USP, 14049-900 - Ribeirão Preto, SP, e-mail: esramos@genbov.fmrp.usp.br

⁹ Mestre em Ciências Agrárias – Grupo de Pesquisa “Biotecnologia Aplicada ao Melhoramento Animal – UFRB - Cruz das Almas Bahia, e-mail: ma_aragao@yahoo.com.br

Resumo

O crescimento nos animais é controlado por um sistema complexo no qual o eixo somatotrópico tem um importante papel. Os genes que regulam este eixo são responsáveis pelo crescimento pós-nascimento, principalmente o GH que tem ação no crescimento dos ossos e músculos. Possíveis relações entre o polimorfismo do gene do hormônio de crescimento (GH) com características de precocidade sexual em bovinos da raça Nelore foi objetivo do trabalho. O DNA foi extraído em 181 amostras de sangue e amplificados por PCR seguidos pela digestão com enzima de restrição AluI (RFLP). O genótipo do hormônio de crescimento foi analisado em gel de agarose a 2%. Os resultados da técnica de RFLP evidenciaram apenas um genótipo para a enzima AluI proporcionando frequência de 100% do alelo Leu.

Palavras chaves: Bovinos de Corte, Marcador Molecular, Precocidade.

Abstract

The growth in the animals is controlled for a complex system in which the somatotrópico axis has an important paper. The genes that regulate this axis are responsible for the growth after - birth, mainly the GH that has action in the growth of the bones and muscles. Possible relations between the polymorphism of the gene of the hormone of growth (GH) with characteristics of sexual precocities in bovines of the Nelore breed were objective of the work. The DNA was extracted in 181 samples of blood and amplified by PCR followed for the digestion with enzyme of AluI restriction (RFLP). The genotype of the growth hormone was analyzed in gel of agarose 2%. The results of the RFLP technique had evidenced only one genotype for the AluI enzyme providing frequency of 100% of allele Leu.

Key words: Beef Cattle, Molecular Marker, Precocities

1- Introdução

O GH como o nome sugere, é obrigatoriamente o hormônio do crescimento e desenvolvimento. Está também envolvido nos processos de diferenciação e maturação da puberdade, participa da esteroidogênese, gametogênese e ovulação além de desempenhar papel importante na gestação e lactação. Têm despertado o interesse o polimorfismo Leu/Val de uma única base no quinto exon do gene GH em bovinos. Este produz duas variantes do gene, que diferem pela presença de um leucine (Leu) ou do valine (Val) no segmento 127 do amino-ácido (Lucy et al., 1991). A variante de Leu foi associada com uma liberação mais elevada do GH na raça German Black (Schlee et al., 1994) e em uma liberação mais baixa do GH na Polish Friesian. Nas raças Nelore, Simental e Simbrasil foram identificados e caracterizados três regiões do gene GH. Entretanto a raça Simbrasil não se encontrava em equilíbrio e os animais selecionados para produção de carne apresentavam polimorfismo diferentes dos animais selecionados para produção de leite (Ferraz, 2001). Otaviano et al., (2004), verificaram que a região do exon V do gene GH em búfalos não foi considerado como um marcador molecular para a seleção de animais superiores no rebanho estudado. Encontraram apenas um genótipo para a enzima AluI com a frequência de 100% do genótipo Leu. O objetivo do trabalho foi identificar o polimorfismo do Hormônio de Crescimento em bovinos da raça Nelore em rebanhos do Estado da Bahia.

2-Material e Métodos

Cerca de 181 fêmeas jovens da raça Nelore pertencente a três propriedades do Estado da Bahia, foram genotipadas para verificação do polimorfismo do gene do hormônio de crescimento

(GH). Utilizaram-se as técnicas de PCR (Reação em Cadeia de Polimerase) e RFLP (Polimorfismo do Comprimento de Fragmentos de Restrição) com a enzima AluI. O DNA genômico foi extraído de 10 ml de sangue, empregando-se o método de extração e precipitação do DNA em NaCl. Para a reação de PCR utilizou-se os seguintes iniciadores 5'-GTGGGCTTGGGGAGACAGAT-3' (posição,1940) e 5'-GTCGTCAGTGCATGTTTG-3' (posição 2202) (Lucy et al., 1991). Esta ocorreu utilizando-se 40 ng de DNA genômico, 5 pmol de cada primer, 0.1 mM de dNTP, 1.5 mM de MgCl₂, 50 mM de KCl, 10 mM de Tris-HCl, e 0.4 U de Taq polimerase somando um total de 25 µl. O PCR foi realizado usando temperatura de 94°C por 2 minutos para desnaturação seguidos de 30 ciclos de um regime específico da temperatura. Cerca de 10 µl da reação de PCR foram digeridos a 37° *overnight* juntamente com 1,5 µl de tampão de reação, 3,1 µl de água e 5 unidades da enzima de restrição Alu-I num volume total de 15 µl. Para a análise dos produtos da digestão, utilizaram-se géis de agarose a 2% e posteriormente corados com brometo de etídeo, para visualização dos tamanhos dos fragmentos resultantes, tendo como referência o padrão de tamanho molecular de 1 Kb DNA "ladder".

3- Resultados e discussão

A metodologia aplicada para extração de DNA permitiu boa visualização pela integridade do produto obtido, com concentração que variou de 200 a 1250 ng/µl sendo usados 50 ng para aplicação do PCR. Os iniciadores indicados amplificaram um fragmento composto de 282 pares de bases que corresponde ao exon V do gene do hormônio de crescimento de bovinos. A aplicação da enzima AluI resultou em fragmentos de 150, 82 e 50 pares de bases para todos os animais estudados caracterizando o genótipo Leu/Leu.

No rebanho analisado, os resultados são opostos aos relatados por Lechniak (1999), que encontrou alta frequência do alelo Val/Val em bovinos de corte e alta frequência do alelo Leu em bovinos de leite.

Otaviano et al. (2004), identificaram o polimorfismo no exon V utilizando a mesma técnica (PCR-RFLP). Em 96 búfalos analisados evidenciaram apenas um genótipo para a enzima AluI, com frequência de 100% do genótipo Leu/Leu. Os autores concluíram que no fragmento do gene estudado a restrição da enzima não foi considerada um marcador molecular para seleção de animais superiores.

Dados de literatura (Istasse et al. 1999) indicaram variabilidade do gene do hormônio de crescimento em bovinos, sendo o alelo Val atribuído à produção de carne e diferenças individuais no início da puberdade (Verde, 1987).

4-Conclusões

Considerando o número de animais analisados, o fragmento do gene estudado não pode ser considerado como um marcador molecular para precocidade sexual, pois a aplicação da técnica RFLP, pelo uso da enzima AluI, permitiu identificar a frequência de 100% do genótipo Leu/Leu. Tendo em vista os resultados obtidos, outros fragmentos do mesmo gene serão incluídos em experimento em animais da Bahia.

Referências Bibliográficas

FERRAZ, A.L.J. Identificação de polimorfismo no gene do hormônio de crescimento (GH) em raças de bovinos de corte. Trabalho de graduação em Zootecnia, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP. Jaboticabal. SP. 2001.53p.

ISTASSE, L., VAN EENAEME, C., EVRARD, P., GABRIEL, A., BALDWIN, P., MAGHUIN-ROGISTER, G., BIENFAIT, J.M. Animal performance, plasma hormones and metabolites in Holstein and Belgian Blue growing-fattening bulls. **Journal of Animal Science**, Canada, 68, v.9, p. 2666-2673, 1990.

Lucy, M. C.; Hauser, S. D.; Eppard, P. J.; Krivi, G. G.; Clark, J. H.; Bauman, D. E.; Collier, R. J. Genetic polymorphism within the bovine somatotropin (bST) gene detected by polymerase chain reaction and endonuclease digestion. **J. Dairy Sci.**, United States of América, v. 74, p. 284, 1991.

OTAVIANO, A.R.; MARCHIORI, K.S.; SENNA, J.A.D.; LEMOS, M.V.F.; FERRAZ, A.L.; TONHATI, H. Estudo do V exon do gene do hormônio de crescimento de búfalo *Bubalis bubalis* por reação em cadeia de polimerase-polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição (PCR- RFLP). In: V Simpósio da Sociedade de Melhoramento Animal. 2004, Pirassununga. **Resumos**. SP: Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal, 2004.

SCHLEE, P.; GRAML, R.; SCHALLENBERGER, E.; SCHAMS, D.; ROTTMANN, O.; OLBRICH-BLUDAU, A.; PIRCHNER, F. Growth hormone and insulin-like growth factor. I. Concentrations in bulls of various growth hormone genotypes. **Theor. Appl. Genet., Germany**, v. 88, p.497-500, 1994.

SØRENSEN, P.; GROCHOWSKA, R.; HOLM, L.; HENRYON, M.; LØVENDAHL, P. Polymorphism in the bovine growth hormone gene affects endocrine release in dairy calves. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.85, p.1887-1893, 2002.

VERDE, L.S., TRENKLE, A. Concentrations of hormones in plasma from cattle with different growth potentials. (1987) **Journal of Animal Science**, Canada, 64 (2), pp. 426-432.

Anexo

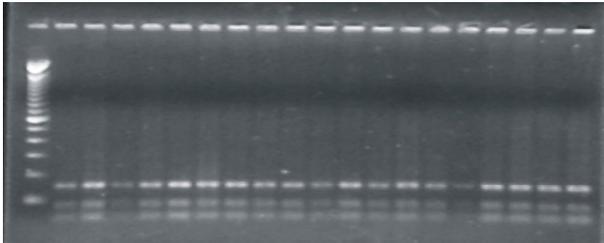


Figura 1 - Produtos resultantes da digestão da enzima AluI no gene GH, corados com brometo de etideo como referência o padrão de tamanho molecular de 1 Kb DNA "ladder"

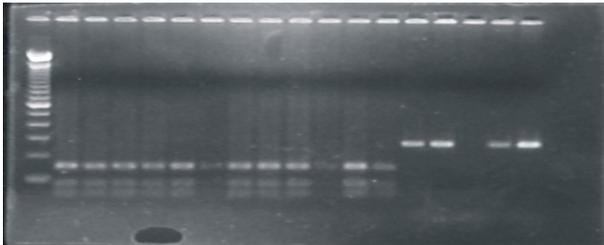


Figura 2 - Produtos resultantes da digestão da enzima AluI no gene GH, corados com brometo de etideo como referência o padrão de tamanho molecular de 1 Kb DNA "ladder"(12 primeiros poços).Produto amplificado por PCR (282 pb) do gene GH, resultante da utilização do par de oligonucleotídeos para o gene GH (4 poços finais a direita).