

Relação entre polimorfismo do gene do hormônio do crescimento e características de precocidade em novilhas da raça Nelore

[Relationship between polymorphism of growth hormone and precocity traits in Nelore heifers]

M.V. Andrea¹, M.V.M. Gomes², C.R. Marcondes³, K.N. Oliveira^{4*}, E.S. Ramos², S.B. Fonteles¹

¹Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas - UFRB – Cruz das Almas, BA

²Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP – Ribeirão Preto, SP

³Embrapa Pecuária Sudeste – Belém, PA

⁴Aluna de graduação - CCAAB-UFRB – Cruz das Almas, BA

RESUMO

Avaliaram-se as relações entre o polimorfismo do gene do hormônio do crescimento (GH) e as características de precocidade, em novilhas da raça Nelore. Amostras de sangue periférico foram obtidas de 181 animais de três rebanhos distintos do estado da Bahia, nas quais foi realizada a extração de DNA e a amplificação por PCR, seguidas por digestão com enzima de restrição *AluI*. Os fragmentos resultantes da digestão enzimática foram analisados em gel de agarose 2% para determinação dos respectivos genótipos. A frequência do alelo Leu nas amostras analisadas foi estimada em 100%. Em decorrência da alta incidência de homozigose para o alelo Leu, sugere-se que o *restriction fragment length polymorphism AluI* do gene GH não possa ser considerado como marcador molecular para precocidade sexual em novilhas Nelore nesses rebanhos.

Palavras-chave: bovino de corte, marcador molecular, precocidade

ABSTRACT

The relationships between polymorphism of growth hormone gene (GH) and precocity traits in Nelore heifers were evaluated. A total of 181 animals from three different farms of Bahia state, Brazil, were blood sampled. The DNA of each animal was extracted, amplified by PCR, and digested by "AluI" restriction enzyme, and the resultant fragments were analyzed in 2% agarose gel for genotype identification. The frequency of Leu allele in the analyzed samples was estimated in 100%. Due to the high incidence of homozygosity for the Leu allele, it is suggested that the restriction fragment length polymorphism AluI of GH gene can not be considered as a molecular marker for sexual precocity in Nelore heifers of those herds.

Keywords: molecular marker, beef cattle, precocity, growth hormone

INTRODUÇÃO

A produção de bovinos de corte brasileira, em sua maioria representada por zebuínos, constitui atividade econômica e social muito importante. Contudo, a baixa eficiência reprodutiva observada nos animais *Bos indicus* quando comparados às raças taurinas é um fator que tende a limitar o crescimento econômico (Chenoweth, 1991). Dentre os objetivos de seleção considerados pelos diversos programas

de melhoramento, o crescimento acelerado e a precocidade sexual constituem um grande desafio. A seleção de animais jovens pode acelerar o progresso genético por meio da redução do intervalo de gerações. A diminuição das idades ao primeiro cio, ao primeiro parto e ao abate resulta em grande impacto na produtividade total, uma vez que há redução dos custos de manutenção, aumento da taxa de desfrute e de rendimento e melhoria da qualidade da carne para a comercialização e/ou exportação.

Recebido em 19 de maio de 2010

Aceito em 10 de janeiro de 2011

*Autor para correspondência (*corresponding author*)

E-mail: kalyoliveira@hotmail.com

Apoio: FAPESB, FAPESP e CNPq.

Face às dificuldades operacionais para organização de programas de seleção para idade à puberdade, torna-se importante a utilização de características indicadoras de precocidade sexual, que tenham variabilidade genética adequada, que sejam de mensuração fácil e econômica, e que tenham correlação genética favorável com a idade à puberdade e com outras características economicamente importantes (Bergmann, 1998).

Dentre as metodologias para alcançar estes objetivos, o uso de marcadores de DNA têm mostrado alguns *loci* que afetam as características qualitativas e quantitativas, evidenciando genótipos superiores em animais de interesse zootécnico e possibilitando acessar diretamente o genótipo de um indivíduo. Marcadores moleculares são polimorfismos encontrados em segmentos específicos de DNA, os quais seguem as leis mendelianas do mecanismo de herança e são causados por pequenas alterações (mutações) na sequência de nucleotídeos (Silveira, 2002).

Por meio das técnicas de *Single Strand Conformation Polymorphism* (SSCP) e de *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), podem-se identificar polimorfismos no gene do hormônio de crescimento (GH) de importância na pecuária, associados à precocidade, ao ganho de peso, entre outros fatores importantes, para aumentar a produção dos rebanhos em curto espaço de tempo. Este gene está envolvido em processos de diferenciação e maturação da puberdade, participando da esteroidogênese, gametogênese e ovulação, além de desempenhar papel importante na gestação e lactação.

No melhoramento genético dos bovinos, tem despertado interesse o polimorfismo Leu/Val de uma única base no quinto exon do gene do GH. Este produz duas variantes do gene, que diferem pela presença de um aminoácido, leucina (Leu) ou valina (Val), no segmento 127 da cadeia polipeptídica (Lucy et al., 1991).

Schlee et al. (1994), ao utilizarem a técnica de RFLP, descreveram os genótipos para a presença/ausência do sítio de digestão da enzima *AluI*, sendo considerados *AluI* -/- os homozigotos para ausência do sítio de digestão, *AluI* +/+, os homozigotos para a presença do sítio de digestão,

e *AluI* +/-, os heterozigotos para o sítio de digestão. Considerando-se que o genótipo *AluI* (-) resulta na troca do aminoácido leucina (Leu) na posição 127 pelo aminoácido valina (Val), os genótipos *AluI* (+/+), *AluI* (+/-), *AluI* (-/-) correspondem, na proteína, à Leu/Leu, Leu/Val e Val/Val, respectivamente.

A presença do aminoácido valina no GH foi associada negativamente com o mérito genético para animais selecionados, tendo em consideração as diferenças esperadas na progênie (DEP) para a produção de leite (Lee et al., 1996). Esses autores sugeriram que vacas grandes à época da maturidade sexual apresentaram elevada frequência do alelo leucina (L), quando comparadas às vacas de menor tamanho corporal neste período.

A variante Leu foi associada à liberação mais elevada do GH na raça German Black e à liberação mais baixa do GH na Polish Friesian (Schlee et al., 1994). Nas raças Nelore, Simental e Simbrasil, foram identificadas e caracterizadas três regiões do gene GH. Entretanto, a raça Simbrasil não se encontrava em equilíbrio, e os animais selecionados para produção de carne apresentavam polimorfismos diferentes dos selecionados para produção de leite (Ferraz, 2001).

Este trabalho teve o objetivo de verificar a frequência do polimorfismo do hormônio de crescimento em bovinos da raça Nelore, de três rebanhos no estado da Bahia, a fim de utilizá-lo como marcador molecular para precocidade sexual.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de DNA genômico foram obtidas de sangue periférico (veia jugular) de 181 fêmeas jovens da raça Nelore pertencentes a três propriedades particulares no estado da Bahia, que participam do Programa de Melhoramento Genético da Raça Nelore (PMGRN). Neste programa, utiliza-se o método de extração e precipitação do DNA em NaCl (Olerup e Zetterquist, 1992).

A região de interesse do gene do hormônio de crescimento (exon 5) foi amplificada por meio da técnica Polimerase Chain Reaction (PCR), sendo utilizados 40ng de DNA genômico, 5pmol de

Relação entre polimorfismo...

cada *primer*; 0,1mM de dNTP; 1,5mM de MgCl₂, 50mM de KCl, 10mM de Tris-HCl e 0,4U de Taq polimerase em volume final de 25µl. Foram utilizados os seguintes *primers*: *sense*: 5'-GTGGGCTTGGGGAGACAGAT-3' (posição 1940) e *anti-sense*: 5'-GTCGTCAGTGCATGTTT-3' (posição 2202) (Lucy et al., 1991).

O produto de amplificação (282pb) foi, em seguida, submetido à digestão com a endonuclease *AluI*, conforme recomendações do fabricante (Invitrogen). Os produtos resultantes da digestão foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 2%, corados com brometo de etídeo. Desse modo, era esperada, nos animais homozigotos para a presença do sítio de restrição para *AluI*, visualização de três fragmentos – 150pb, 82pb e 50pb.

As DEPs da avaliação genética de junho de 2008 foram obtidas junto ao PMGRN, tabeladas para cálculo dos valores médios e comparadas à tabela de percentil de todos os animais da base de dados do programa.

RESULTADOS

A RFLP para a enzima *AluI* revelou alta frequência do genótipo *+/+* (Leu/Leu) nas amostras analisadas (Fig. 1).

Os valores médios das DEPs das novilhas estudadas foram tabelados e comparados quanto à classificação na base geral do PMRGN (Tab. 1). Observa-se que, nas DEPs para área do olho de lombo (AOL, em cm²), pesos à pré-desmama (P120 e P240 (em kg), perímetro escrotal com um ano de idade (PE365, em cm), produtividade

acumulada – índice que relaciona a capacidade reprodutiva e a habilidade materna – (PAC, em kg de bezerros desmamados/ano) e mérito genético total (MGT) – índice que relaciona ganho de peso, capacidade reprodutiva e habilidade materna –, as novilhas foram bem classificadas, ficando entre as 20 melhores (TOP 20 e 40%).

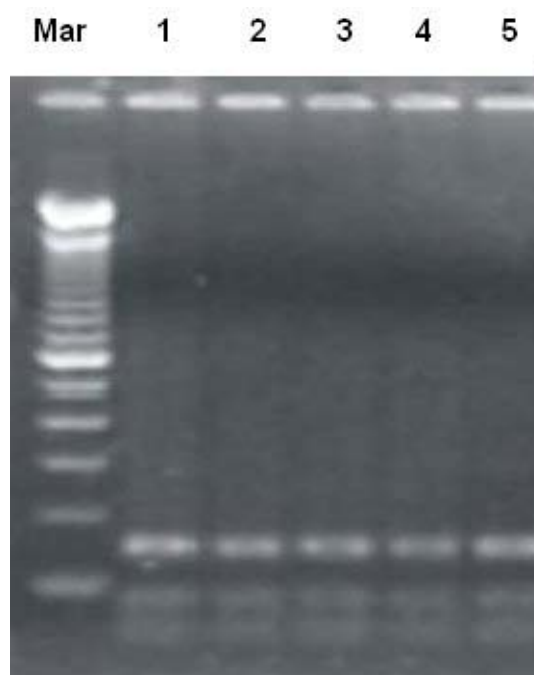


Figura 1. Visualização em gel de agarose do genótipo correspondente à homozigose *+/+* para o polimorfismo RFLP *AluI* no gene GH observado em Nelore. Mar = marcador de peso molecular (100 pb); 1,2,3,4 e 5 representam genótipos de animais participantes do presente estudo. Genótipo similar foi observado nos demais animais participantes deste estudo.

Tabela 1. Valores médios das diferenças esperadas na progênie (DEP) e acurácias (Acc) de diferentes características produtivas de novilhas da raça Nelore, comparadas à classificação geral do Programa de Melhoramento Genético da Raça Nelore

DEP	Valor	Acc	TOP (%)
AOL (cm ²)	0,18	0,07	20
P120 (kg)	2,59	0,22	25
PE365 (cm)	0,14	0,13	25
PAC (kg bezerro desmamado/ano)	3,01	0,11	25
P240 (kg)	3,65	0,23	30
MGT	4,03	-	40

AOL: área do olho do lombo; P120 e P240: pesos aos 120 e 240 dias de idade; PE: perímetro escrotal aos 365 dias de idade; PAC: produtividade acumulada; MET: mérito genético total.

DISCUSSÃO

Ficou demonstrada a exclusividade do genótipo $+/+$ em bovinos da raça Nelore no estado da Bahia. Com base nessa evidência, levanta-se a hipótese de que a ausência dos genótipos $+/-$ e $-/-$ deve ter ocorrido em razão da seleção a que o rebanho Nelore está sendo submetido nos últimos 50 anos no estado da Bahia.

Sendo assim, sugere-se que isto possa ser um indício da relação entre o genótipo Leu/Leu e a maior produção e adaptabilidade do Nelore no país. Entretanto, em virtude da ausência das variantes polimórficas $+/-$ e $-/-$ nesse grupo amostral, não foi conclusiva a determinação do real efeito desse polimorfismo como marcador de seleção. Estudos adicionais que envolvam maior número de animais podem revelar dados adicionais quanto ao real papel desse polimorfismo como marcador de precocidade.

Em vacas de alta produção leiteira, foi observada maior frequência do genótipo L/L do que do genótipo L/V, e frequência muito baixa de V/V (Lucy et al., 1993; Yao et al., 1996). Em outro trabalho, o genótipo $+/-$ (L/V) apresentou menor nível plasmático de GH e maior de IGF-1 e foi observado em animais com maior valor genético para ganho de peso e crescimento (Schlee et al., 1994).

A habilidade para mobilizar as reservas corporais para sobrevivência e reprodução é um fator importante na determinação do valor adaptativo dos animais (Silveira, 2002). A adaptação do Nelore às escassas condições de nutrição na Índia está ligada à atuação da seleção natural, que resulta em aumento da frequência do alelo *Alu* (+) na população de Nelore. À semelhança dos resultados encontrados no presente trabalho, em nenhum trabalho com zebuínos foi detectada a presença do alelo *Alu* (-) (Rosa, 1997; Tambasco et al., 2000; Kemenes et al., 1999; Maranhão, 2003).

CONCLUSÕES

A alta incidência do genótipo Leu/Leu do RFLP *AluI* do gene GH observada no presente trabalho pode revelar a importância do alelo Leu deste polimorfismo na seleção do Nelore quanto à precocidade.

APOIO FINANCEIRO

Este trabalho contou com apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERGMANN, J.A.G. Indicadores de precocidade sexual em bovinos de corte. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE RAÇAS ZEBUÍNAS, 3., 1998, Uberaba. *Anais...* Uberaba: ABCZ, 1998. p.145-155.

CHENOWETH, P.M. *Bos indicus* bulls- how different are they. *Proceedings of the Annual Meeting of Society of Theriogenology*, p.117-122, 1991.

FERRAZ, A.L.J. *Identificação de polimorfismo no gene do hormônio de crescimento (GH) em raças de bovinos de corte*. 2001. 53f. Trabalho de graduação em Zootecnia – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, Jaboticabal, SP.

KEMENES, P.A.; REGITANO, L.C.A.; ROSA, A.J.M. et al. K-casein, B-lactoglobulin and growth hormone allele genetic distances in Nelore, Gyr, Guzerá, Caracu, Charolais, Canchim and Santa Gertrudis cattle. *Genet. Mol. Biol.*, v.22, p.539-541, 1999.

LEE, B.K.; CROOKER, B.A.; MURTAUGH, M.P. et al. Association of somatotropin (bST) gene polymorphism with selection for milk yield in Holstein cows. *J. Dairy Sci.*, v.76, Suppl.1, p.149, 1996.

LUCY, M.C.; HAUSER, S.D.; EPPARD, P.J. et al. Genetic polymorphism within the bovine somatotropin (bST) gene detected by polymerase chain reaction and endonuclease digestion. *J. Dairy Sci.*, v.74, p.284, 1991.

LUCY, M.C.; HAUSER, S.D.; EPPARD, S.D. et al. Variants of somatotropin in cattle: gene frequencies in major dairy breeds and associated milk production. *Domest. Anim. Endocrinol.*, v.10, p.325, 1993.

Relação entre polimorfismo...

MARANHÃO, A.M. *Efeito do polimorfismo do gene do GH e suas relações com os níveis de IGF-1, progesterona e escore corporal, produção de leite e dias em aberto em vacas Holandesas no início da lactação*. 2003. 104f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

OLERUP, O.; ZETTERQUIST, H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens*, v.39, p.225-235, 1992.

ROSA, A.J.M. *Caracterização da raça Nelore e teste de paternidade por marcadores moleculares*. 1997. 114f. Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiróz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.

SCHLEE, P.; GRAML, R.; SCHALLENBERGER, E. et al. Growth hormone and insulin-like growth factor. I. Concentrations in bulls of various growth hormone genotypes. *Theor. Appl. Genet.*, v.88, p.497-500, 1994.

SILVEIRA, L.G.G. *Níveis plasmáticos de igf-i e polimorfismo do gene do hormônio de crescimento (GH) como possíveis indicadores do potencial produtivo em bovinos de corte*. 2002. 52f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP.

TAMBASCO, D.D.; ALENCAR, M.M.; COUTINHO, L.L. et al. Caracterização molecular de animais da raça Nelore utilizando microsatélites e genes candidatos. *Rev. Bras. Zootec.*, v.29, p.1044-1049, 2000.

YAO, J.; AGGREY, S.E.; ZADWORNÝ, D. et al. Sequence variations in the bovine growth hormone gene characterized by single-strand conformation polymorphisms (SSCP) analysis in their association with milk production traits in Holsteins. *Genetics*, v.144, p.1809, 1996.