

### Caracterização dos íntrons 2 e 4 e éxon 5 do gene *GHRL* em bovinos da raça Nelore<sup>1</sup>

Camila Urbano Braz<sup>2</sup>, Gregório Miguel Ferreira de Camargo<sup>3</sup>, Diércles Francisco Cardoso<sup>3</sup>, Patrícia Dias Silva Fonseca<sup>3</sup>, Joslaine Noely dos Santos Gonçalves Cyrillo<sup>4</sup>, Humberto Tonhati<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Parte da tese de mestrado do primeiro autor, financiada pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científica e Tecnológico (CNPq)

<sup>2</sup>Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento Animal – FCAV/Unesp-Jaboticabal. Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científica e Tecnológico (CNPq). e-mail: [camila\\_urbano@yahoo.com.br](mailto:camila_urbano@yahoo.com.br)

<sup>3</sup>Pós-graduando em Genética e Melhoramento Animal – FCAV/Unesp-Jaboticabal

<sup>4</sup>Pesquisadora científica do Centro de Pesquisa em Pecuária de corte - Instituto de Zootecnia - Sertãozinho

<sup>5</sup>Professor Titular do Departamento de Zootecnia – FCAV/Unesp - Jaboticabal

**Resumo:** O hormônio da grelina é produzido pela parede do estômago e estimula o consumo alimentar pela ação que o mesmo exerce sobre o hipotálamo. Na regulação do balanço energético, a grelina aumenta a ingestão alimentar e diminui o gasto energético. Por seu papel biológico, o gene é candidato a ser estudado por marcadores moleculares devido sua influência características relacionados à ingestão e ao balanço energético. Assim estudaram-se regiões do gene do hormônio da grelina em bovinos da raça Nelore por PCR/sequenciamento para verificar-se a variabilidade dos *loci*. Os fragmentos amplificados por dois pares de *primers*, os quais compreendiam os íntrons 2 e 4 (parcialmente) e o éxon 5 do gene *GHRL*, foram sequenciados de 17 animais da raça Nelore menos aparentados e encontraram-se seis SNPs nessas regiões. As regiões estudadas são polimórficas indicando que um estudo posterior com a genotipagem de um maior número de animais e a associação desses SNPs como as características de interesse é necessário e viável de ser feito.

**Palavras-chave:** *Bos taurus indicus*, grelina, marcador molecular, sequenciamento, SNP

### Characterization of intron 2 and 4 and exon 5 of *GHRL* gene in Nelore cattle

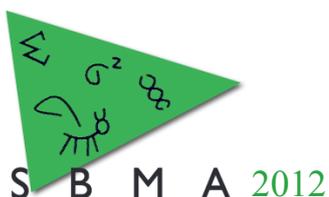
**Abstract:** The hormone ghrelin is produced by stomach lining and stimulates feed intake by its action in hypothalamus. In the regulation of energy balance, ghrelin increases feed intake and decreases energy expenditure. By this biological role, the gene is a candidate to be studied by molecular markers due to its influence in feed intake and energy balance. So, regions of ghrelin gene were studied in Nelore cattle by PCR/sequencing in order to verify the *loci* variability. The fragments amplified by two primer pairs, that encoded the regions of intron 2 and 4 (partial) and exon 5 *GHRL* gene were sequenced for seventeen unrelated Nelore animals and six SNPs were found in these regions. These regions are polymorphic and it indicates that others studies with a higher numbers of animals e the SNPs association with traits of interest is necessary and viable to be done.

**Keywords:** *Bos taurus indicus*, ghrelin, molecular marker, sequencing, SNP

### Introdução

O hormônio da grelina é produzido pela parede do estômago e estimula o consumo alimentar pela ação que o mesmo exerce sobre o hipotálamo (Kojima et al., 1999) e estimula a secreção de GH (hormônio do crescimento) atuando mediante receptores específicos distintos acoplados à proteína G (Martinelli et al., 2008), de forma que alterações em seu gene podem estar associadas a variações no peso de bovinos em diferentes idades, pois o GH é um dos principais fatores que influenciam diretamente o crescimento do indivíduo. De acordo com Hinney et al. (2002), na regulação do balanço energético, a grelina aumenta a ingestão alimentar e diminui o gasto energético, realizando uma ligação entre o trato gastrointestinal e o cérebro.

Segundo com Colinet et al. (2009), o gene *GHRL* em bovinos é composto de 5 éxons e 4 íntrons. Os éxons 1, 2, 3, 4 e 5 possuem comprimentos de 21pb, 134pb, 114pb, 109pb e 154pb, respectivamente. A região codificadora compreende os éxons 2 (parcialmente), 3, 4 e 5 (parcialmente). A investigação da presença de polimorfismos em genes candidatos e o estudo da associação entre esses marcadores e



## IX Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

João Pessoa, PB – 20 a 22 de junho de 2012

características de produção podem contribuir para gerar um conhecimento novo, que futuramente pode ser empregado para auxiliar os programas de melhoramento genético na seleção precoce de animais por meio da seleção assistida por marcadores (MAS).

O objetivo desse trabalho foi verificar a presença de polimorfismos nos íntrons 2 e 4 e no éxon 5 do gene da grelina em bovinos da raça Nelore.

### Material e Métodos

O DNA foi extraído a partir de folículos pilosos com uso da metodologia de Fenol-Clorofórmio-Álcool Isoamílico de 17 animais menos aparentados entre si. Foram utilizados os *primers* 5' TGCATTGCCAGGTGGGTTCTCTAC 3' e 5'AGAATCTGCAGGCCCGCGTGAAGT 3', os quais amplificaram uma região de 409 pb que abrangia uma parte do íntron 2 e 5' GGGAGGAGAGCAGACACAGT 3' e 5' TGACCACAGACCAGGAATTG 3' que amplificaram uma região de 437 pb que compreendia uma parte do íntron 4 e o éxon 5.

As reações de amplificação continham um volume final de 50 µL, de acordo com o protocolo da GoTaq Colorless Master Mix (Promega). Para os ciclos de amplificação, foi utilizada a programação: 94°C por 2 min, 94°C por 45 seg, 64,3°C por 45 seg, 72°C por 1 min (32 ciclos) e 72°C por 5 min.

O sequenciamento dos produtos de PCR foi realizado através da técnica de terminação de cadeia por dideoxynucleotídeos (ddNTPs), sendo que as sequências obtidas foram visualizadas e analisadas para a identificação dos polimorfismos através do programa CodonCode Aligner.

### Resultados e Discussão

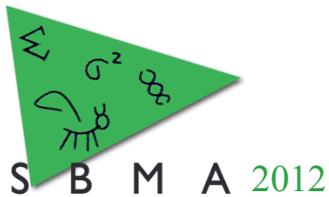
Os pares de *primers* amplificaram as regiões do íntron 2 (parcialmente), do íntron 4 (parcialmente) e do éxon 5. Na região amplificada do íntron 2 (parcialmente), identificaram-se seis polimorfismos do tipo SNP. Na região amplificada correspondente, o íntron 4 (parcialmente) e o éxon 5, foram encontrados dois SNPs, um no íntron 4 e outro no éxon 5. O SNP do éxon 5 está em região não codificante 3'UTR. Na Tabela 1, pode-se verificar a descrição e a localização dos SNPs.

Tabela 1 Indicação, região e tipo de substituição e localização no gene do polimorfismo.

Polimorfismo	Região	Tipo de substituição	Localização do SNP no gene
1	Íntron 2	T/C	g.2794
2	Íntron 2	T/C	g.2823
3	Íntron 2	A/G	g.2961
4	Íntron 2	C/G	g.3163
5	Íntron 4	C/T	g.3165
6	Éxon 5	A/G	g.3167

Sun et al. (2011), identificaram 11 SNPs no gene *GHRL* em bovinos, sendo que todos estão em regiões não codificadoras, portanto nenhum está diretamente ligado com os mecanismos de transcrição e tradução. Sherman et al, encontraram um SNP no íntron 3 no gene *GHRL* em bovinos (*Bos taurus taurus*) e este demonstrou pequenas associações com características de eficiência alimentar e de carcaça. O que condiz com a função da grelina em promover a liberação de GH e assim influenciar no crescimento (Kojima et al., 1999). Embora esse SNP esteja no íntron 3 e assim não alterando na formação do aminoácido, ele pode estar em desequilíbrio de ligação com outro SNP no *GHRL* com efeitos mais acentuados para essas características, o que pode explicar a associação (Sherman et al., 2007).

Os mecanismos dessas alterações genéticas em regiões não codificantes não são completamente elucidados. Eles não causam mudanças nos aminoácidos, entretanto é possível que esses SNPs possam estar em uma região de splicing e assim afetar a formação da proteína. Segundo Greenwood & Kelso, 2003 e LeHir et al., 2003 citados por Sun et al. (2011), os íntrons podem afetar a eficiência da transcrição de genes em várias espécies.



### Conclusões

Foi realizada a caracterização parcial dos íntrons 2 e 4 e do éxon 5 do gene *GHRL* em bovinos da raça Nelore. Foram encontrados seis polimorfismos para o gene da grelina, sendo os primeiros descritos para a raça estudada. Os *loci* analisados são polimórficos e a genotipagem de uma maior quantidade de animais e a associação desses SNPs com características de interesse econômico faz-se importante, uma vez que a seleção assistida por marcadores moleculares pode ajudar a aumentar o ganho genético, especialmente em características de difícil mensuração como eficiência alimentar.

### Literatura citada

- COLINET, F.G; PORTETELLE, D.; RENAVILLE, R. Molecular characterization of the bovine *GHRL* gene (Short Communication). **Archiv Tierzucht**, v.52, p.79-84, 2009.
- HINNEY, A.; HOCH, A.; GELLER, F., SCHÄFER, H., SIEGFRIED, W., GOLDSCHMIDT, H., REMSCHMIDT, H; HEBEBRAND, J. Ghrelin gene: identification of missense variants and a frameshift mutation in extremely obese children and adolescents and healthy normal weight students. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.87, p.2716-24, 2002.
- KOJIMA, M.; HOSODA, H.; DATE, Y; NAKAZATO, M.; MATSUO, H.; KANGAWA, K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. **Nature**, v.402, p.656-60, 1999.
- MARTINELLI, C.E.; CUSTÓDIO, R.J.; AGUIAR-OLIVEIRA, M.H. Fisiologia do Eixo GH-Sistema IGF. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.52, p.717-725, 2008.
- SHERMAN, E.L.; NKUMAH, J.D.; MURDOCH, B.M.; LI, C.; WANG, Z.; FU, A.; MOORE, S.S. Polymorphisms and haplotypes in the bovine neuropeptide Y, growth hormone receptor, ghrelin, insulin-like growth factor 2, and uncoupling proteins 2 and 3 genes and their associations with measures of growth, performance, feed efficiency, and carcass merit in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v.86, p.1-16, 2007.
- SUN, J.; JIN, Q.; ZHANG, C.; FANG, X.; GU, C.; LEI, C.; WANG, J.; CHEN, H. Polymorphisms in the bovine ghrelin precursor (*GHRL*) and Syndecan-1 (*SDC1*) genes that are associated with growth traits in cattle. **Molecular Biology Reports**, v.38, p.3153-3160, 2011.