



CARACTERIZAÇÃO DA HETEROZIGOSE NO GENE DO RECEPTOR DO HORMÔNIO LUTEINIZANTE (LHR) EM ANIMAIS DA RAÇA NELORE¹

MINOS ESPERÂNDIO CARVALHO², LUIS GUSTAVO GIRARDI FIGUEIREDO³, ERICA PEREZ MARSON³, PAULA RIPAMONTE³, FLÁVIO VIEIRA MEIRELLES⁴, JOSÉ BENTO STERMAN FERRAZ⁵, JOANIR PEREIRA ELER⁵

¹ Projeto apoiado pelo CNPq, FAPESP;

² Aluno de Iniciação Científica;

³ Alunos do Doutorado FZEA/USP;

⁴ Professor da FZEA/USP, Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento (LMMD);

⁵ Professores da FZEA/USP, GMA, Grupo de Melhoramento Animal, (GMA);

Departamento de Ciências Básicas – ZAB, FZEA/USP;

Av. Duque de Caxias Norte, 225. Cx. Postal 23, CEP - 13635900 Pirassununga, SP

RESUMO - Objetivou-se caracterizar a frequência de heterozigose no gene do receptor do hormônio luteinizante (LHR) em uma população de animais da raça Nelore. O DNA foi extraído de 46 animais e a identificação dos genótipos foi realizada por PCR-RFLP. A análise dos resultados envolveu a estimação das frequências gênicas e genotípicas e a probabilidade de equilíbrio de Hardy-Weinberg foi obtida pelo teste de Qui-quadrado. Foi possível identificar três genótipos distintos para o gene do LHR, (TT, CT e CC), sendo as frequências genotípicas observadas de 78,3%, 17,4% e 4,3%, respectivamente, registrando-se maior frequência gênica do alelo T (87%). A população mostrou-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($P>0,05$). O polimorfismo no LHR possibilitou a identificação genotípica, bem como a caracterização da heterozigose na população estudada, constituindo-se como um marcador genético.

PALAVRAS-CHAVE: genótipos, heterozigose, LHR e marcador genético

HETEROZYGOSITY CHARACTERIZATION OF THE LUTEINIZING HORMONE RECEPTOR GENE IN NELLORE BREED ANIMALS

ABSTRACT - The aim of this study was to characterize the frequency of heterozygosity in the luteinizing hormone receptor gene (LHR) in Nelore breed population. DNA extraction was performed on 46 animals and the identification of the genotypes was obtained by PCR-RFLP. Results analysis included the estimation of the gene and genotypic frequencies. The Hardy-Weinberg equilibrium was tested by Chi-square test. It was possible to identify three distinct genotypes to LHR gene, (TT, CT and CC), with 78.3%, 17.4% and 4.3% of genotypic frequencies, respectively. The higher gene frequency was record in T allele (87%) and the population were in the Hardy-Weinberg equilibrium ($P>0.05$). The LHR allowed the genotypic identification, and the characterization of heterozygosity in the studied population, to be further tested as genetic marker.

KEYWORDS: genotypes, heterozygosity, LHR and genetic marker

INTRODUÇÃO

A produção de bovinos de corte nacional vem mostrando uma evolução nos índices produtivos e reprodutivos. De acordo com dados do ANUALPEC (2002), estima-se que o rebanho nacional tenha ultrapassado 166 milhões de cabeças. No Brasil, o rebanho azebuado corresponde a aproximadamente 80% do total de animais, destacando-se a raça Nelore como a raça zebuína de maior frequência, principalmente devido às suas características de rusticidade e adaptabilidade em condições tropicais. Estudos dedicados a seleção animal demonstram que, além dos conceitos de genética quantitativa, as técnicas moleculares podem potencializar os métodos de seleção. Portanto, os marcadores moleculares podem ser amplamente utilizados visando avaliar a variabilidade genética de populações em programas de seleção. Marcadores que apresentam elevado grau de polimorfismo possibilitam a caracterização de indivíduos heterozigotos, o que justifica o uso desta ferramenta molecular para determinar heterozigose. Genes candidatos cuja função fisiológica é conhecida, como o hormônio gonadotrófico luteinizante (LH) ou o hormônio folículo estimulante (FSH), produzidos na hipófise anterior se ligam aos seus receptores específicos, presentes na superfície da membrana plasmática das células alvo nas gônadas (Thibault *et al.*, 1993). Estudos em humanos enfatizam que mutações nos receptores do LH e FSH (LHR e FSHR, respectivamente) podem levar à ativação ou

inativação destes receptores, promovendo respostas fisiológicas variadas (Chan, 1998; Themmen *et al.*, 1998). Mutações inativas do LHR podem causar alterações como ovários policísticos, amenorréia primária e infertilidade (Wu e Chan, 1999). Embora Milazzotto (2001) não tenha estabelecido uma associação entre as mutações encontradas no gene do LHR com a manifestação da característica precocidade sexual em fêmeas da raça Nelore, fortes indícios demonstraram que a precocidade sexual em *Bos indicus* (Nelore) esteja associada a fatores genéticos, confirmando a importância da continuidade dos estudos que buscam marcadores moleculares para tal característica. A avaliação das seqüências descritas nos estudos de Milazzotto (2001) no gene do LHR, possibilitou a escolha de endonucleases de restrição que viabiliza a utilização do marcador do tipo RFLP (Polimorfismo no comprimento do fragmento de restrição). O objetivo deste trabalho foi identificar e caracterizar a frequência de heterozigose no gene do LHR, relacionado à precocidade sexual de novilhas, por meio de marcadores RFLP.

MATERIAL E MÉTODOS

Para as análises preliminares, foram selecionados 46 animais da raça Nelore com dados de características fenotípicas conhecidas. O DNA foi obtido a partir de 1 ml sangue como descrito por Sambrook e Russel (2001). Neste procedimento as hemácias foram lisadas com uma solução de 12 mM Tris-HCl pH 8.2, 0,32 M Sacarose, 5 mM EDTA e 1% de TRITON 100X. Os glóbulos brancos peletizados foram digeridos com proteinase K por 3 horas. As proteínas foram então precipitadas com solução de 5 M NaCl e o sobrenadante transferido para outro tubo. O DNA total foi precipitado com adição de 3 volumes de etanol absoluto, desidratado e rediluído em 50 µl de água ultrapura. A região de interesse do gene correspondente ao LHR foi amplificada utilizando-se os primers F: 5' GCCGTGTTGCCTCTTGTGGG 3' e R: 3' GGTCCATGACCATGGCCCGTC 5' (Lussier *et al.*, 1996). Os produtos de amplificação foram digeridos com a enzima *HhaI* por 3 horas a 37°C. Os fragmentos obtidos após restrição foram separados em eletroforese em gel de agarose 1,5%, corados com brometo de etídeo e visualizados em scanner de fluorescência. Os resultados foram analisados pelo teste de Qui-Quadrado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre os 46 animais analisados 78,3% foram homozigotos para o alelo T, 4,3% homozigotos para o alelo C e 17,4% heterozigotos CT, verificando uma alta frequência do alelo T (87%) nos animais de origem *Bos indicus*, em contraposição à maior frequência do alelo C nos animais *Bos taurus* (100%; n=10), relatado em animais da raça Limousin por Milazzotto (2001). Esta diferença na frequência dos alelos T/C entre as espécies justifica o interesse por estudos no gene LHR em relação a informações reprodutivas. Sabidamente existem diferenças significativas de tempo para atingir a puberdade entre animais *Bos indicus* e *Bos taurus*, sendo os primeiros mais tardios. As frequências gênicas foram de 87% para o alelo T e 13% para o alelo C, em concordância com os resultados encontrados por Milazzotto (2001) em animais Nelore. Para os resultados de genotipagem, foi aplicado o teste Qui-Quadrado, concluindo-se que a população apresentou-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($P > 0,05$), justificando o trabalho de caracterização da heterozigose, para estudos adicionais relacionados à dados de interesse produtivo e reprodutivo. Tendo em vista uma possível introgressão do alelo C nos animais *Bos indicus* por cruzamentos absorventes com *Bos taurus*, a ligação desse alelo com características fenotípicas reprodutivas deverá ser avaliada futuramente.

CONCLUSÕES

A interação entre as análises genéticas quantitativa e molecular poderá intensificar a seleção se apresentarem correlações significativas dos níveis de heterozigose com características fenotípicas de interesse. Investigações futuras serão realizadas para avaliar o efeito do gene LHR sobre características reprodutivas e produtivas, visando sua utilização em programa de seleção assistida por marcadores moleculares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANUALPEC: **Anuário da pecuária brasileira**. São Paulo: FNP Consultoria & Comércio: Editora Argos, 2002. 77p.
- CHAN, W. Y. Molecular genetic, biochemical, and clinical implications of gonadotropin receptor mutations. **Mol. Genetic. Metab.**, v. 63, p. 75-84, 1988.



V Simpósio da Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal

- DAVIS, G.P.; DENISE, S.K. The impact of genetic markers on selection. **J. Anim.Sci.**, v.76, n.9, p.233-239, 1998.
- LUSSIER, J. G.; HOUDE, A.; ETHIER, J., ET AL. Complementary DNA structure of the bovine LH receptor. **Vet Biom.**, 1995 (enviado para publicação). Disponível na internet Genbank accession number: U20504. URL: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide>>.
- MILAZZOTTO, M. P. Mutações no gene do receptor do hormônio luteinizante (LHR) bovino e associação com precocidade sexual em fêmeas *Bos primigenius indicus* (Nelore). Dissertação de mestrado. Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista – Campus de Botucatu, 85 p. 2001.
- THEMMEN, A. P.; MARTENS, N.; BRUNNER, H. G. Activating and inactivating mutations in LH receptors. **Mol. Cell. Endoc.**, v.145, p. 137-142, 1998.
- THIBAUT, C.; LEVASSEUR, M. C.; HUNTER, R. H. F. **Reproduction in mammals and man**. Paris: Aubin Imprimeur, 1993. 800 p.
- WU, S.M.; CHAN, W.Y. Male pseudohermaphroditism due to inactivating luteinizing hormone receptor mutations. **Arch. Med. Res.**, v.30, n.6, p.495-500, 1999.