



EFEITO DOS POLIMORFISMOS DOS GENES DO LHR E DO FSHR SOBRE A PRECOCIDADE SEXUAL EM NOVILHAS DE CORTE DE DIFERENTES COMPOSIÇÕES RACIAIS¹

ERICA PEREZ MARSON², JOSÉ BENTO STERMAN FERRAZ³, FLÁVIO VIEIRA MEIRELLES⁴, JÚLIO CÉSAR DE CARVALHO BALIEIRO³, JOANIR PEREIRA ELER³, GERSON BARRETO MOURÃO², LUÍS GUSTAVO GIRARDI FIGUEIREDO²

¹Apoio financeiro: Fapesp

²Doutorandos – Departamento de Ciências Básicas, Grupo de Melhoramento Animal – FZEA/USP. Caixa postal 23, CEP.13635-970, Pirassununga, SP. Email: epmarson@usp.br

³Prof. Dr. Departamento de Ciências Básicas, Grupo de Melhoramento Animal – FZEA/USP.

⁴Prof. Dr. Departamento de Ciências Básicas, Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento, FZEA/USP.

RESUMO - Os polimorfismos dos genes dos receptores do hormônio luteinizante (LHR) e do folículo estimulante (FSHR) foram investigados em 370 novilhas Europeu-Zebu, de diferentes composições raciais, com o objetivo de se conhecer as frequências gênicas e genotípicas e avaliar possíveis efeitos sobre a característica precocidade sexual. A análise dos sítios polimórficos oriundos da digestão com as endonucleases de restrição *HhaI* e *AluI*, possibilitou a caracterização dos genótipos, respectivamente para os genes do LHR (TT, CT e CC) e do FSHR (GG, CG e CC), constatando-se maior frequência de animais heterozigotos para ambos os genes, em todas as composições raciais estudadas. Não se observou efeito dos genes investigados ($P>0,9188$ e $P>0,8831$, respectivamente para o LHR e FSHR) sobre a precocidade sexual. A análise PCR-RFLP possibilitou a identificação dos genótipos, bem como a caracterização da heterozigose. Entretanto, os resultados obtidos não justificam a inclusão dos marcadores RFLP dos genes LHR e FSHR em programas de seleção para a precocidade sexual em novilhas de corte.

PALAVRAS-CHAVE: LHR, FSHR, precocidade sexual, RFLP, novilhas de corte

POLYMORPHISM EFFECTS OF LHR AND FSHR GENES ON THE SEXUAL PRECOCITY IN BEEF HEIFERS FROM DIFFERENT BREED COMPOSITIONS

ABSTRACT - The polymorphism of the luteinizing hormone receptor (LHR) and of the follicle-stimulating receptor (FSHR) genes were investigated in 370 European-Zebu beef heifers from different breed composition. The objectives were to recognize the genotypic and gene frequencies and to evaluate possible effects of the genes on the sexual precocity trait. The genotypes were characterized by polymorphic sites analysis from digestion with *HhaI* and *AluI* restriction endonucleases, respectively for LHR (TT, CT and CC) and FSHR genes (GG, CG and CC), recording higher frequency of heterozygous animals for both genes in all breed composition studied. It was not observed effect of the studied genes ($P>0.9188$ and $P>0.8831$, respectively for LHR and FSHR) on sexual precocity. It was possible to identify the genotypes and to characterize the heterozygosity by PCR-RFLP analysis. Even so the observed results do not justify the inclusion of RLPF markers of LHR and FSHR genes in selection programs of sexual precocity in beef heifers.

KEYWORDS: LHR, FSHR, sexual precocity, RFLP, beef heifers

INTRODUÇÃO

A obtenção de bovinos de corte em sistemas de cruzamento que envolve raças de diferentes aptidões encontra-se cada vez mais em expansão no Brasil. O objetivo desta abordagem é combinar melhores características otimizando os efeitos da heterose e complementaridade de raças. Tal estratégia permite o aproveitamento dos efeitos da heterozigose dos diversos *loci* envolvidos em características de interesse econômico, condicionadas, em sua maioria, por poligenes, o que dificulta a identificação dos melhores genótipos.



V Simpósio da Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal

Entretanto as pesquisas dedicadas ao estudo dos genes em animais domésticos, viabilizada por diferentes técnicas de biologia molecular, têm possibilitado conhecer, através de diferentes marcadores moleculares, as propriedades genéticas de populações e identificar genes importantes na determinação destas características de interesse, incrementando os tradicionais métodos de seleção animal, aumentando o ganho genético nas futuras gerações (Unanian, 1997). Dentre estes marcadores destacam-se os polimorfismos de fragmentos de restrição (RFLP) que reconhecem seqüências específicas alteradas por mutações em genes candidatos, possibilitando ainda a caracterização dos indivíduos heterozigotos.

A manifestação precoce da puberdade em fêmeas bovinas é desejável em sistemas de produção. A predileção recai pelas fêmeas que se reproduzem o mais precocemente possível em sua vida reprodutiva. Hess (2002) ressalta que as novilhas precisam atingir a puberdade um a três meses antes da estação de monta, para melhorar suas chances de concepção e de produzirem suas crias. Em virtude deste fato e adicionado à existência de moderada herdabilidade para esta característica (0,40; Martin *et al.*, 1992), a precocidade sexual é indicada como critério de seleção de novilhas de corte.

Os hormônios gonadotróficos luteinizante (LH) e folículo estimulante (FSH), cuja ação é mediada via ligação a receptores de membrana específicos em células alvo apresentam funções essenciais à manifestação da idade à puberdade. De acordo com Aittomaki *et al.* (1995), deleções ou mutações nos genes de receptores podem alterar a interação hormônio/receptor, mudando a transdução do sinal endocrinológico, podendo interferir na resposta fisiológica esperada. Assim a estratégia de avaliação dos hormônios gonadotróficos na manifestação da puberdade deve estar associada ao estudo dos genes dos seus receptores, respectivamente, o LHR e o FSHR.

Este trabalho teve como objetivos conhecer as freqüências gênicas e genótípicas e avaliar os efeitos dos polimorfismos nos genes do LHR e do FSHR, por análise PCR-RFLP, na precocidade sexual de novilhas de corte de diferentes composições raciais.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de sangue para extração de DNA foram obtidas de 370 novilhas, nascidas entre agosto e dezembro de 2001, distribuídas em seis diferentes composições raciais Europeu-Zebu, sendo criadas em duas regiões brasileiras. Visando proteger as informações dos criadores e garantir a imparcialidade das análises, as composições genótípicas dos animais, bem como seus respectivos ambientes criatórios foram codificados.

Com base nos resultados de polimorfismos por SSCP nos genes do LHR (Milazzoto, 2001) e do FSHR (Campagnari, 2002), elegeu-se, respectivamente, dois fragmentos de interesse que foram submetidos à análise PCR-RFLP. Os genótipos foram posteriormente identificados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% pela ausência ou presença do sítio de restrição reconhecido pelas endonucleases de restrição específicas *HhaI* e *AluI*, respectivamente, para os genes do LHR e do FSHR.

A análise dos resultados envolveu a estimação das freqüências gênicas e genótípicas para os dois locos estudados (Weir, 1996). Para mostrar as implicações dos resultados moleculares sobre a característica de interesse precocidade sexual, empregou-se os dados zootécnicos referentes ao diagnóstico de gestação por ocasião da primeira estação de monta em que as novilhas foram submetidas. Deste modo, a avaliação dos efeitos dos marcadores foi sobre a ocorrência (1) ou não (0) de prenhez (probabilidade de prenhez) na primeira estação de monta.

Adotou-se um modelo que considerou os efeitos dos genótipos para ambos os genes estudados, fazenda de origem dos animais, composição racial e a covariável peso ajustado aos 390 dias de idade (linear e quadrático), além do efeito residual. O procedimento adotado foi o PROC GENMOD do programa *Statistical Analysis System* (SAS, 2000), admitindo-se distribuição binomial com função de ligação logística.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise PCR-RFLP possibilitou a identificação de três genótipos para cada gene estudado. Para o LHR/*HhaI* foi encontrado os genótipos TT, CT e CC e para o FSHR/*AluI*, os genótipos GG, CG e CC, tal como relatado, respectivamente por Milazzotto (2001) e Campagnari (2002) na raça Nelore.

As freqüências genótípicas observadas para o gene do LHR variaram de 0 a 9%; 37 a 85% e 15 a 57%, respectivamente, para os genótipos TT, CT e CC, nas seis diferentes composições raciais de

Europeu-Zebu, registrando-se maior frequência de heterozigose, aspecto relevante considerando-se a origem da população aqui estudada. Estes resultados confirmam o esperado quando comparados aos relatados por Milazzotto (2001) na população Nelore, que mostrou maiores frequências genóticas de TT (54%) contra 43 e 3%, respectivamente, para os genótipos CT e CC.

De acordo com esta autora o genótipo CC é característico de animais europeus, por ter sido identificado em animais da raça Limousin na frequência de 100% (n=10), atribuindo-se ao genótipo TT, característico de animais *Bos indicus*. No presente estudo o alelo C predominou em todos os animais genotipados, mostrando frequências gênicas variando de 58 a 76% contra 24 a 42% para o alelo T. A presença do alelo C (25 %) na população Nelore sugere a participação de animais europeus segregando nesta população zebuína, em algum momento de sua formação, o que estimula estudos adicionais do gene do LHR. Em adição, a análise RFLP para este gene possibilitou a identificação dos genótipos, inclusive dos heterozigotos, indicando-se a investigação deste marcador genético em estudos de genética populacional.

Para o gene do FSHR, as frequências genóticas observadas variaram de 8 a 35%, 45 a 79% e 13 a 25%, respectivamente, para os genótipos GG, CG e CC, registrando-se tal como para o LHR maior frequência de heterozigose em todas as composições raciais estudadas. As frequências gênicas para o alelo G oscilaram entre 47 e 58% contra 42 a 53% para o alelo C, havendo superioridade do alelo C em relação ao G em quatro composições raciais.

Os resultados obtidos para o FSHR no presente estudo não coincidem ao preconizado por Campagnari (2002), que atribuiu o genótipo CC ser característico de animais europeus ao constatar 100% deste em 10 animais da raça Limousin e o genótipo GG, de *Bos indicus*. Entretanto a maior frequência observada para o genótipo CG em relação ao GG (51 contra 49%) na população *Bos indicus* (Nelore) estudada por esta autora, aliado ao pequeno número amostral de animais *Bos taurus* genotipados não fornecem subsídios consistentes para contradizer os resultados aqui obtidos. Deste modo, sugere-se pesquisas adicionais para o gene do FSHR em diferentes populações bovinas.

No presente estudo, a taxa de prenhez encontrada para a população de novilhas Europeu-Zebu foi de 63,5%, resultado bastante interessante, considerando a idade média destas fêmeas ao entrarem em sua primeira estação de monta (13,5 meses). As novilhas heterozigotas foram as que apresentaram as melhores taxas de prenhez em relação às demais (67 e 66%, respectivamente para os genes do LHR e FSHR). Entretanto, embora o modelo de distribuição proposto para o conjunto de dados disponíveis tenha sido adequado, não se constatou efeito dos polimorfismos nos genes do LHR ($P>0,9188$) e do FSHR ($P>0,8831$) sobre a precocidade sexual de novilhas de diferentes composições raciais estudadas. Estes resultados não justificam a inclusão destes marcadores RFLP na seleção assistida por marcadores em programas de melhoramento genético.

Estudos anteriores também não demonstraram efeito dos genes do LHR (Milazzotto, 2001) e do FSHR (Campagnari, 2002) sobre a precocidade sexual em novilhas da raça Nelore, avaliada pela da frequência de fêmeas precoces ou não precoces aos 14 meses, utilizando-se o teste de χ^2 (Qui-quadrado). Algumas hipóteses que justificariam os resultados encontrados no presente estudo poderiam ser atribuídas ao número total de animais analisados e à distribuição desproporcional entre as composições raciais nas duas fazendas de origem envolvidas.

Como já salientado, a idade a puberdade é influenciada geneticamente, podendo ser reduzida por meio da seleção genética permitindo a escolha de raças ou de animais mais precoces. Entretanto é importante ressaltar que a manifestação da puberdade é influenciada não somente pelo LHR e FSHR, mas também por outros genes igualmente importantes que também estão envolvidos na expressão desta característica.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo não justificam a seleção de novilhas para a característica precocidade sexual em programas de melhoramento genético, utilizando-se marcadores moleculares RFLP dos genes do LHR e FSHR. Entretanto, ambos os genes foram eficientes como marcadores genéticos, no que diz respeito à caracterização dos genótipos dos animais e na identificação dos indivíduos heterozigotos, podendo ser empregados futuramente em estudos que se deseje conhecer uma população quanto as suas propriedades e variabilidade genética.



V Simpósio da Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal

A maior frequência de heterozigose observada para ambos os genes em todas as composições raciais investigadas, reflete a presença de variabilidade genética na população de animais Europeu-Zebu, o que viabiliza a exploração do potencial destes animais para a obtenção de características produtivas e reprodutivas de interesse econômico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CAMPAGNARI, F. **Novas variantes moleculares dos genes dos receptores do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRHR) e do hormônio folículo estimulante (FSHR) em fêmeas *Bos primigenius indicus* (Nelore)**. Botucatu: Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, 2002. 82p. Dissertação (Mestrado em Genética) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, 2002.
- HESS, B.W. Estratégias para antecipar a puberdade em novilhas. In: NOVOS ENFOQUES NA PRODUÇÃO E REPRODUÇÃO DE BOVINOS, 6., 2002, Uberlândia, MG. **Anais...** Uberlândia: CONAPEC Jr., 2002. p.118-126.
- MARTIN, L. C.; BRINKS, J. S.; BOURDON, R. M.; CUNDIFF, L.V. Genetic effects on beef heifer puberty and subsequent reproduction. **J. Anim. Sci.**, v.70, n.12, p.4006-4017, 1992.
- AITTOMAKI, K.; DIEGUEZ, J.L.L.; PAKARINEN, P. *et al.* Mutation in FSH receptor gene causes hereditary hypergonadotropic ovarian failure. **Cell**, v.82, p.959-968, 1995.
- MILAZZOTTO, M.P. **Mutações no gene do receptor do hormônio luteinizante (LHR) bovino e associação com precocidade sexual em fêmeas *Bos primigenius indicus* (Nelore)**. Botucatu: Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, 2001. 85p. Dissertação (Mestrado em Genética) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, 2001.
- SAS. **User's Guide, Version 8**. Cary, NC: SAS Institute Inc., 2000.
- UNANIAN, M.M. A procura de marcadores de precocidade em gado Nelore. In: SIMPÓSIO O NELORE DO SÉCULO XXI, 4., 1997, Uberaba, MG. **Anais...** Uberaba: ABCZ, 1997. p. 51-57.
- WEIR, B.S. **Genetic data analysis: methods for discrete population genetic data**. 2.ed. Massachusetts: Sinauer Associates, 1996. 445p.