

ESTUDO DO V EXON DO GENE DO HORMÔNIO DE CRESCIMENTO DE BÚFALO *Bubalus bubalis* POR REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE – POLIMORFISMO DO COMPRIMENTO DO FRAGMENTO DE RESTRIÇÃO (PCR-RFLP)¹

ANTONIO ROBERTO OTAVIANO², KARINA SHIBA MARCHIORI³, JANETE APARECIDA DESIDÉRIO SENNA⁴, MANOEL VICTOR FRANCO LEMOS⁴, ANDRÉ LUIZ FERRAZ⁵, HUMBERTO TONHATI⁵

¹ Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP.

² Doutorando do Departamento de Zootecnia, FCAV-UNESP, Jaboticabal. E-mail: arotaviano@yahoo.com.br

³ Graduada em Zootecnia, FCAV-UNESP, Jaboticabal.

⁴ Docente do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária, FCAV-UNESP, Jaboticabal.

⁵ Mestrando do Departamento de Tecnologia, FCAV-UNESP, Jaboticabal.

⁶ Docente do Departamento de Zootecnia, FCAV-UNESP, Jaboticabal.

RESUMO - O objetivo foi identificar polimorfismo no V éxon do gene do Hormônio de Crescimento em búfalos (buGH) pela técnica PCR-RFLP. A técnica permitiu a amplificação de um fragmento de 401pb, referente ao V exon do gene GH bubalino. Os resultados da técnica de RFLP evidenciaram apenas um genótipo para a enzima “Alu-I” e “Dde-I”, proporcionando frequência de 100% do genótipo L/L (leucina/leucina) (+/+) e (-/-) respectivamente no rebanho estudado. A região do V exon do gene do GH bubalino, restringido com enzimas “Alu-I” e “Dde-I” não pode ser considerado como um marcador molecular para seleção de animais superiores no rebanho estudado.

PALAVRAS CHAVE: alelo, genótipo, homozigose, monomorfismo

STUDY OF V EXON OF THE GENE OF GROWTH HORMONE OF BUFFALO (“*Bubalus bubalis*”) BY POLIMERASE CHAIN REACTION – RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLIMORPHISM (PCR-RFLP)

ABSTRACT - The present study objectified to identify polymorphisms in the V exon of buffalo growth hormone gene (buGH) investigated by PCR-RFLP. The 401 pb fragment of the V exon was digested with “AluI” and “DdeI” restriction enzymes for RFLPs’ identification. The restriction fragments lengths analysis obtained after digestion with “AluI” and “DdeI” allowed verify the presence of only allele L (leucine), providing 100% frequency of genotype L/L (+/+) and L/L (-/-) respectively for the studied population. Therefore, it concludes that of buGH gene V exon is presented monomorphic, and should not be considered a molecular maker for selection of superior animals.

KEYWORDS: allele, genotype, homozygosity, monomorphism

INTRODUÇÃO

Segundo Schlee et al. (1994) mediante a utilização das técnicas de PCR-RFLP (Reação em Cadeia da Polimerase-Polimorfismo do Comprimento de Fragmentos de Restrição) determinaram as frequências do polimorfismo no V exon do gene do GH bovino, caracterizado pela substituição Leucina/Valina na posição 127, de touros de três diferentes raças bovinas. Os autores identificaram três genótipos do GH: L/L (leucina/leucina), L/V (leucina/valina) e V/V (valina/valina).

Yao et al. (1996) utilizando a técnica de SSCP (Polimorfismo de Conformação da Cadeia Simples de DNA) para genotipar animais da raça Holstein. O genótipo denominado GH 4.1 foi caracterizado como uma mutação C→ T na posição 1547 (III íntron do gene), enquanto que o GH 6.2 apresentava uma mutação A→ C na posição 2291 (V exon), e o efeito desses dois genótipos corresponderia a um diferencial de produção da ordem de 300 kg de leite, 8 kg de gordura e 7 kg de proteína por lactação.

Ferraz (2001), identificou e caracterizou polimorfismos em três regiões do gene do GH em bovinos de corte das raças Nelore, Simental e Simbrasil, pela técnica de PCR-RFLP e SSCP. As frequências genotípicas observadas evidenciaram que a raça Simbrasil não se encontrava em equilíbrio para o polimorfismo “Dde-I” e que os animais selecionados para a produção de carne apresentaram polimorfismos diferentes dos animais selecionados para a produção de leite.

Moita (2003) quantificou o efeito da associação dos genes candidatos para GH, IGF-1 e PIT-1, com peso e ganho de peso numa população F2 em bovinos, pela técnica de PCR-RFLP. Os fragmentos obtidos de cada gene apresentaram polimorfismos entre os animais F2 e as frequências genotípicas das amostras para os genes estudados, demonstrando variabilidade entre as populações. As associações dos genes candidatos às características de peso e ganho de peso não foram significativas para os genes GH, IGF-1 e PIT-1. O objetivo foi identificar polimorfismo no V éxon do gene do Hormônio de Crescimento em búfalos pela técnica de PCR-RFLP.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram usadas 96 búfalas em fase de lactação, pertencentes à Fazenda Santa Eliza, município de Dourado, SP. Os animais eram da raça Murrah e mestiços, mantidos em pastagens de "*Brachiaria brizantha*", cv Marandú e "*Panicum maximum*", cv Tanzânia e recebiam suplementação a base de polpa cítrica, caroço de algodão ou cevada e sal mineralizado. A coleta das amostras de sangue de cada búfala foi feita por venipunctura da jugular em tubos "vacutainer" (5ml), sendo armazenados e mantidos a - 20 °C, até a extração do DNA genômico. A extração do DNA genômico dos leucócitos seguiu a metodologia descrita por Zadworny & Kuhnlein (1990).

Com base na seqüência do gene do GH bovino publicada por Gordon et al. (1983), com o número de acesso no GenBank (gi/163091) foi sintetizado um par de "primer" (P11 e P12), utilizando-se deste par de iniciadores, foi amplificado o fragmento correspondente ao V éxon do GH búfalo.

As reações de amplificação foram realizadas num volume final de 25 µL, contendo 100 ng de DNA, 0,5 µM de cada "primer", 1X PCR "buffer" [10 mM Tris-HCl (pH 9,0), 1,5 mM MgCl₂ e 50 mM KCl], 100 µM de dNTPS, 0,5 U de Taq DNA polimerase. Os ciclos de amplificação seguiram a programação descrita por Ferraz (2001), em termociclador PTC-100 MJ, da seguinte forma: 94 °C por 120 segundos, seguido de 40 ciclos (94 °C, 60 segundos; 59 °C, 60 segundos; 72 °C, 60 segundos) e 72 °C, 5 minutos.

O fragmento referente ao V éxon do GH bubalino foi digerido a 37°C, por aproximadamente 2,5 horas, utilizando-se 15µL da reação de amplificação, 1/10 de tampão de reação e 5 unidades da enzima de restrição "Alu-I" e "Dde-I", separadamente, num volume final de 20µL.

Os produtos dessa digestão foram separados por eletroforese em géis de agarose, que foram depois corados com brometo de etídeo, para identificação do tamanho do fragmento resultante, tendo como referência o padrão de tamanho molecular de 1 Kb DNA "ladder" ou o padrão de tamanho molecular 100pb (GIBCO - BRL). No fragmento do V éxon do bGH existem três sítios para a enzima "Alu-I" que reconhece as seqüências 5'...AG↓CT...3', 3'...TC↑GA...5' e um sítio de restrição para a endonuclease "Dde I" que reconhece as seqüências 5'...C↓TNAG...3, 3'...GANT↑C...5'.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A extração do DNA total permitiu obter amostras com qualidade satisfatória, as quais foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,8%, evidenciando a presença de DNA íntegro, de alto peso molecular com concentração das amostras variou de 1,0 a 3,0 µg/mL e a solução de trabalho foi diluída para a concentração de 50ng/mL. Os iniciadores P11 e P12, amplificaram um fragmento de 401pb correspondente ao V éxon do GH bubalino. O resultado da digestão do fragmento correspondente ao V éxon do GH bubalino com a enzima "AluI", resultou em fragmentos de 185, 131, 50 e 35pb para todos os animais estudados, caracterizando o genótipo +/+. Portanto, na amostra estudada, ocorre a presença de um único alelo para a enzima "AluI", no qual não possui polimorfismo no sítio de restrição "Alu-I", na posição 1447pb, onde teria a substituição de C→G, leucina (L) por valina (V), conforme ocorre no alelo para o GH bovino. Houve 100% de ocorrência do genótipo +/+, que caracteriza o genótipo L/L (leucina/leucina) no rebanho bubalino analisado. Para as análises de restrição com a enzima "Dde-I", verificou-se para todas as amostras a ocorrência de dois fragmentos: um com 359pb e um com 42pb, caracterizando todos os animais como pertencentes ao genótipo -/-, ou seja, com ausência de um sítio "Dde-I", o que pode ser devido à mutação A→C, na posição 1595pb, como ocorre em bovinos. Estes fragmentos correspondem aproximadamente ao tamanho daqueles esperados para o alelo do GH bovino, quando da restrição do fragmento V éxon com a enzima "Dde-I", exceto que, neste caso, existe a presença de mais um fragmento, em torno de 12pb, proveniente da digestão do sítio "Dde-I" presente no iniciador P12. Portanto, houve 100% de ocorrência do genótipo -/-, não apresentando este rebanho bubalino o alelo+, o qual produziria os fragmentos esperados: 42,191 e 168pb, após a digestão dos dois sítios "Dde-I", presentes no V éxon do seu hormônio de crescimento.

Os resultados obtidos no presente trabalho corroboram com aqueles encontrados por Mitra et al. (1995), quando estudaram o polimorfismo para “Alu-I”, também no V exon do GH, em 53 búfalas da raça Murrah e 19 da raça Nili-Ravi. Segundo os autores, todos os animais apresentaram o L/L (leucina/leucina). Para verificar se o monomorfismo do GH era espécie específico, eles analisaram 11 amostras de DNA provenientes de búfalos Egípcios e encontraram que todos eram homozigotos para o alelo L. Os autores concluíram que a variante valina não existe em búfalos, ou no mínimo, é muito rara. Para a digestão com a enzima “MspI”, os autores verificaram que todos os 83 bubalinos estudados (Murrah, Nili-Ravi, Egípcio) foram monomórficos para o alelo L.

CONCLUSÕES

A técnica de RFLP permitiu a amplificação de um fragmento de 401pb, referente ao V exon do gene GH bubalino.

Os resultados da técnica de RFLP evidenciaram apenas um genótipo para a enzima “Alu-I” e “DdeI”, proporcionando a frequência de 100% do genótipo L/L (leucina/leucina) (+/+) e (-/-) respectivamente no rebanho estudado.

A região do V exon do gene do GH bubalino, restringido com as enzimas “Alu-I” e “Dde-I” não pode ser considerado como um marcador molecular para a seleção de animais superiores neste rebanho estudado.

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.
- GORDON, D.F.; QUICK, D.P.; ERWIN, C.R. et al. Nucleotide sequence of the bovine growth hormone chromosomal gene. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 33, p. 81, 1983.
- MITRA, A.; SCHLEE, P.; BALAKRISHNAN, C.R.; PIRCHNER, F. Polymorphism at growth-hormone and prolactin loci in Indian cattle and buffalo. **J. Anim. Breed. And Genet.**, v. 112, p. 71-74, 1995.
- MOITA, A.K.F. **Estudo da associação de genes candidatos (gGH, IGF-1 e PIT-1) com características de peso e ganho de peso numa população F2 em bovinos.** Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento Animal). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – UNESP. Jaboticabal, SP. 2003. 46p
- Schlee P, Graml R, Schalleberger 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.
- YAO, J. et al. Sequence variations in the bovine growth hormone gene characterized by single-strand conformation polymorphisms (SSCP) analysis and their association with milk production traits in Holsteins. **Genetics**, v. 144, p. 1809, 1996.
- ZADWORNÝ, D.; KUHLEIN, U. The identification of the kappa-casein genotype in Holstein dairy cattle using the polymerase chain reaction. **Theor. Appl. Genetic.**, v.80, p.631-634, 1990.