

VIII Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Maringá, PR – 01 e 02 de julho de 2010

Melhoramento Animal no Brasil: UMA VISÃO CRÍTICA

Polimorfismo de DNA da Região do Éxon 4 ao Éxon 5 no Gene do Hormônio de Crescimento em Linhagem de Frango de Corte Desenvolvida na Universidade Federal de Viçosa (U.F.V.).¹

Ana Paula Ribeiro De Jesus ² & Ricardo Frederico Euclides ³

¹Parte da dissertação de mestrado do primeiro autor, financiada pela Capes

²Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em em Nutrição e Produção Animal - FMVZ/UNESP - Botucatu/SP – Brasil. Rua Prefeito Benedito Martins, 659. Cep 65.500.000 e-mail btptoular@hotmail.com. (98) 8882-7512.

³Orientador e professor titular do Departamento de Zootecnia, UFV. rbaja@ufv.br.

Resumo: Este trabalho teve como objetivo estudar a estrutura molecular do gene do hormônio de crescimento em uma linhagem de frango de corte desenvolvida pela Universidade Federal de Viçosa - MG, em busca de variações de nucleotídeos, relacionando essas variações com a seleção para ganho de peso. Utilizou-se a técnica da reação em cadeia da polimerase. Para tanto, foi designado o par de oligonucleotídeo que flanqueava parte do éxon 4 até éxon 5 do gene. Amostras de DNA de 200 aves desta linhagem, foram genotipadas para a busca de variações genéticas. Polimorfismos de trocas de bases (mutação de ponto) e uma deleção de 51 pares de bases, entre os nucleotídeos 3103 e 3155, região do intron D, do mapa descrito por TANAKA et al. (1992), foram encontrados. Em decorrência a estes polimorfismos, 29% do produto de amplificação desta região apresentou padrão de migração de bandas heteroduplex, 62% apresentaram padrão homoduplex sem deleção e 9% homoduplex com deleção. A alteração na seqüência de DNA reflete-se na seqüência do RNA e das proteínas correspondentes. Neste trabalho, foram encontrados os principais tipos de mutação: mutações pontuais, inserção e deleção. Entretanto, não foi possível associar as variações genéticas deste gene com sua atuação sobre característica de ganho de peso.

Palavras-chave: Hormônio de crescimento, Polimorfismo de DNA, Frango de corte

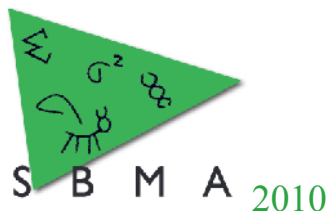
Polymorphism of dna in the region of the exon 4 to exon 5 of the growth hormone in poultry developed lines at u.f.v.

Abstract: An experiment was carried out aiming to study the molecular structure of growth hormone gene in an autobred line for broiler chickens developed at the Federal University of Viçosa, Minas Gerais State. I searches for nucleotide variations and attenyted to correlate these variations with poultry selection for weight gain. The polymerase chain reactions was used to amplify the oligonucleotide pairs which flanked the region of the exon 4 to exon 5 of the gene. DNA samples of 200 poultries from this line were analysed for genetic variations. Polymorphisms of basis shifts (point mutation) and one deletion of 51 bases pairs between the nucleotide 3103 and 3155, intron D region of the map described by TANAKA et al. (1992) were found. Because of these polymorphisms, 29% of amplified products presented of heteroduplex bands, 62% presented a homoduplex pattern without deletion and 9% homoduplex with deletion. Although alteration in the DNA sequence reflects upon the sequence of the RNA and the corresponding proteins, it was not possible to associate the genetic variations of this gene with weight gain.

Keywords: Growth Hormone, Polymorphism of DNA, Poultry

Introdução

A avicultura é a atividade da agropecuária que apresentou os maiores índices de evolução nas últimas décadas. A maior exigência do mercado importador e consumidor fez com que houvesse melhoria na carcaça de frangos de corte. A redução da gordura abdominal é hoje, desejada pelos consumidores e produtores. O produtor está interessado em reduzir custos e desperdícios. Características que influenciam economicamente, como conversão alimentar, produção de ovos e carne são prioritárias



VIII Simposio Brasileiro de Melhoramento Animal

Maringá, PR – 01 e 02 de julho de 2010

Melhoramento Animal no Brasil: UMA VISÃO CRÍTICA

para o avicultor. Com isso, genes codificadores das características desejadas passaram a ser "selecionados" em uma ave comercial destinada à produção de alimentos. O gene do hormônio de crescimento afeta uma grande variedade de parâmetros fisiológicos tais como controle de apetite, crescimento, composição corporal, envelhecimento e reprodução, bem como a resposta imune.

KUHNLEIN et al. (1997), analisando o gene do hormônio de crescimento em 12 linhagens de galinha Leghorn Brancas selecionadas para características de produção de ovos, resistência à doença de Marek e/ou ao vírus da leucose aviária, revelaram polimorfismos de fragmentos de restrição (RFLPs) em três sítios MSP I e um no sítio SAC I. Análise de variância nesta linhagem indicou que o alelo do GH co-selecionado com resistência estava associado com um atraso no início da ovulação, porém também estava associado com uma maior persistência de ovulação conforme a idade aumentava, resultando num aumento global da produção de ovos de 15%. O alelo GH associado com resistência foi dominante para o estabelecimento da ovulação e recessivo para a persistência da produção de ovos.

Conforme GODDARD et al. (1995), variantes genéticas no gene do hormônio de crescimento (GH) em galinhas mostraram serem responsáveis por descobertas tais como nanismo ou acromegalia, indicando a associação de mutações com efeitos fenotípicos importantes.

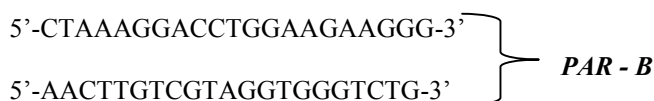
FOTOUHI et al. (1993), trabalhando com linhagens de aves para corte, revelaram que o gene GH em aves para abate é altamente polimórfico. Encontraram fragmentos de RFLPs em três sítios MSP I, localizado no intron 1 e um no sítio SAC I, localizado no intron 4, segregando para pelo menos cinco alelos diferentes. MOU et al. (1995), estudando também o gene do hormônio de crescimento em galinhas melhoradas para corte e em White Leghorns, encontrou 196 pares de bases a mais do que estavam esperando. Este fragmento extra, estava presente no nucleotídeo +308 do mapa descrito por TANAKA et al., 1992.

Diante do exposto, este estudo teve como objetivo investigar a estrutura molecular do gene do hormônio de crescimento numa linhagem melhorada de frango de corte, desenvolvida pela Universidade Federal de Viçosa - MG na busca de variações de nucleotídeos.

Material e Métodos

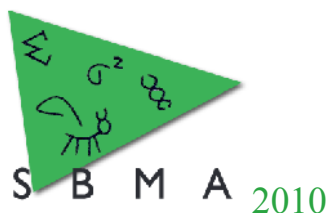
Neste trabalho, foram analisadas amostras de DNA, extraído de células eritrocitárias, de aves de uma linhagem melhorada de frango de corte, desenvolvida pela Universidade Federal de Viçosa. A granja de melhoramento genético de aves da Universidade Federal de Viçosa, local onde foram coletadas as amostras de sangue, está alocada na fazenda Boa Vista, município de Viçosa-MG, com uma área total de 77,8740 hectares. Os galpões onde estavam alojadas as aves são de 105 X 14 metros. Foram coletados por punção venosa diretamente em "ependorfis" heparinizados e estéreis, com agulhas estéreis, aproximadamente 0,5 ml de sangue de cada animal selecionado. Após a coleta, as amostras foram resfriadas a 4°C, e processadas para extração do DNA, a qual foi realizada no laboratório de Melhoramento Genético da Universidade Federal de Viçosa. O DNA foi extraído de acordo com SAMBROOK et al. (1989), com modificações. Para amplificar o fragmento da região do éxon 4 (posição 2414 pb) ao éxon 5 (posição 3577 pb) do gene do hormônio de crescimento de galinha (TANAKA, et al., 1992; número de acesso ao Genbank D10484 - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) foi utilizado o par de oligonucleotídeo designado por KUHNLEIN et al. (1997), o qual gera um produto de 1163 pares de bases (pb).

De acordo KUHNLEIN et al. (1997) o fragmento de 1163 pb possui um sítio para a Msp I e um sítio para a Sac I, originando fragmentos de 585 e 578 pb para a Msp I e 1024 e 139 pb para a Sac I. O par de oligonucleotídeo ("primers"), está descrito abaixo:



Fonte: Extraídos de KUHNLEIN et al. (1997).

O "primer" foi analisado quanto a sua fidelidade ao gene GH de galinha através do acesso ao banco de dados de seqüência de nucleotídeos disponíveis no NCBI (National Center for Biotechnology



VIII Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Maringá, PR – 01 e 02 de julho de 2010

Melhoramento Animal no Brasil: UMA VISÃO CRÍTICA

Information, National Institutes of Health-USA), endereço eletrônico: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. A síntese dos “primers” foi realizada pela empresa GIBCO BRL. Os produtos da PCR foram digeridos com enzimas de restrição, que reconhecem seqüências específicas no gene do GH de galinha.

As endonucleases utilizadas neste trabalho são listadas na tabela abaixo:

Enzima	Sítio de Restrição	Temperatura de Incubação
Msp I	C/cgg	37°C
Sac I	Gagct/c	37°C

Foram utilizados géis de poliacrilamida corados pela prata. A solução era vertida entre duas placas de vidro vedadas nas extremidades, com um pente na parte superior para formar canaletas. O gel era deixado para polimerizar por cerca de 30 minutos. Depois as placas eram montadas numa cuba acrílica para eletroforese, contendo TEB (Tris-EDTA-Borato, M) 1X nos recipientes inferior e superior. Uma alíquota de 5µl das amostras dos produtos da PCR ou dos produtos da digestão, eram diluídos num volume de 2µl de tampão de amostra 2X (Ficoll 400 25%, azul de bromofenol 0,25%) e aplicadas no gel. Para referência de peso molecular e identificação das bandas do fragmento amplificado, todos os géis eram flanqueados de um padrão de peso molecular 1 Kb. As corridas eletroforéticas eram feitas a 150V por 1 hora e 30 min., terminada a corrida os géis eram corados por nitrato de prata. Depois de corado os géis eram analisados para o perfil das bandas e eram secos entre duas folhas de papel celofane.

Resultados e Discussão

O fragmento de 1163 pares de bases produziu em alguns animais bandas específicas de tamanho correspondente ao esperado pela seqüência do gene descrita por TANAKA et al. (1992). Dos 173 animais que extraiu-se o DNA, 131 tiveram o fragmento amplificado.

Vários fatores podem levar a problemas de amplificação, dentre os quais, concentrações inadequadas de reagentes como MgCl₂, dNTPs, tampão, “primers”, Taq polimerase e DNA. Além da importância de se quantificar o DNA extraído. O tamanho do fragmento e a presença de impurezas também levam a falhas na amplificação.

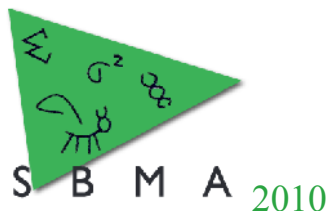
Para todas as amplificações foi utilizado um controle negativo, ou branco, onde o DNA genômico era excluído da reação para se ter a segurança de que, o material a ser amplificado, estaria livre de contaminação por DNA. Além disto, todo material utilizado, desde as ponteiras até a água, era previamente esterilizado para que houvesse pouca chance de contaminação do DNA dos animais.

Uma vez amplificado, o fragmento de 1163 pares de bases foi submetido à digestão com as enzimas de restrição MSP I e SAC I.

Dos 131 produtos da PCR, referentes a amplificação deste fragmento, da linhagem de aves desenvolvida pela U.F.V, apenas 30 amostras digeridas com a enzima de restrição SAC I originaram bandas específicas de tamanho correspondente ao esperado pela seqüência do gene descrita por TANAKA et al. (1992), 27% destes animais possuíam o genótipo +/+, 63% genótipo +/- e 10% genótipo -/- . Já o mesmo fragmento quando submetido à digestão com a enzima de restrição MSP I, produziu, das 131 amostras amplificadas, 106 amostras com bandas específicas de tamanho correspondente ao esperado pela seqüência do gene descrita por TANAKA et al. (1992), 2% com genótipo +/+, 55% genótipo +/- e 43% genótipo -/-, as demais amostras produziram além das esperadas, bandas de tamanhos diferentes do esperado pela seqüência do gene descrita pelos autores acima .

Realizou-se o seqüenciamento de uma das amostras amplificadas com este par de “primer”. Este seqüenciamento foi realizado no laboratório de Biotecnologia do Departamento de Zootecnia da ESALQ. Utilizou-se o sequenciador automático ABI Prism 310. Observou-se que neste fragmento haviam trocas de bases, uma deleção de 51 pares de bases entre o nucleotídeo 3103 e o nucleotídeo 3155, região do íntron D e uma deleção de uma guanina na parte final do éxon 4 (figura 6) do mapa descrito por TANAKA et al. (1992). Esta deleção corresponde a 5 % do tamanho do íntron.

Os introns, porções que não tem função codificante e, portanto, não aparecem representadas na proteína. As regiões com a informação codificada são os éxons. Ao contrário do que ocorre com um éxon, a seqüência nucleotídica exata de um íntron parece não ser importante. Assim, os introns



VIII Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Maringá, PR – 01 e 02 de julho de 2010

Melhoramento Animal no Brasil: UMA VISÃO CRÍTICA

acumularam mutações rapidamente durante a evolução, sendo freqüentemente possível alterar a maior parte da seqüência nucleotídica de um intron sem afetar grandemente a função do gene. As únicas seqüências altamente conservadas em introns são aquelas requeridas para a remoção dos mesmos. Essas seqüências são encontradas nas extremidades dos introns ou muito próximos delas e são muito similares em todas as seqüências de introns conhecidas; elas geralmente não podem ser alteradas sem afetar o processo de "splicing", que normalmente remove a seqüência do intron do transcrito primário de RNA. Essas seqüências flanqueadoras, presentes no sítio de "splice" 5' (sítio doador) e no sítio de "splice" 3' (sítio aceptor) de introns de eucariotos superiores, são G U e A G respectivamente. As reações de quebra e de religação do RNA devem ser executadas precisamente, pois mesmo um erro de um nucleotídeo iria alterar a fase de leitura da molécula de mRNA resultante, tornando a mensagem sem sentido. Baseado no exposto pelos autores, pode-se observar que o polimorfismo observado neste fragmento seqüenciado, ou seja, a deleção ocorrida entre o nucleotídeo 3103 e o nucleotídeo 3155, região do íntron D, parece não alterar a fase de leitura da molécula de mRNA resultante. Porém pode-se notar a deleção de um nucleotídeo guanina (G), na porção final do éxon 4 (Figura 6), deleção esta, que pode afetar a fase de leitura da molécula de mRNA.

Ainda neste fragmento e em decorrência às alterações ocorridas no gene, notou-se que 29% das amostras apresentavam um padrão de migração de bandas heteroduplex, ou seja, houve formação de duas moléculas migrando mais lentamente em relação às bandas homoduplex e 71% apresentavam padrão homoduplex sem deleção. Animais homozigotos para a deleção apresentaram um único fragmento menor e os heterozigotos mostraram dois fragmentos homoduplex em adição a duas bandas heteroduplex que migravam mais lentamente no gel de poliacrilamida.

A caracterização dos alelos pelo seqüenciamento de DNA permitiu explicar a formação das duas moléculas heteroduplexes, observadas nos indivíduos heterozigotos. Duas possíveis combinações entre as fitas simples dos homoduplexes resultou na formação dos heteroduplexes. A fita simples 5'–3' de um homoduplex pode separar no passo de desnaturação e hibridar com a fita simples 3'–5' do outro alelo e, do mesmo modo, a fita simples inferior ao primeiro alelo pode parear com a fita simples superior do segundo alelo.

Conclusões

O que se pode observar destes resultados é que existem variabilidades no fragmento analisado, foi possível detectar polimorfismos através do seqüenciamento.

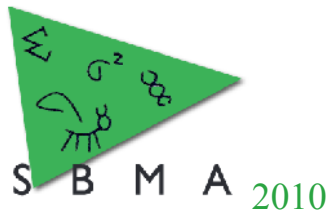
A variabilidade encontrada nos animais estudados não foi até agora descrita na literatura, merecendo portanto maiores estudos com relação a fixação dos polimorfismos frente aos métodos de seleção. Devido à grande importância do GH, têm crescido o interesse no gene que codifica para o mesmo, entretanto não foi possível neste estudo associar as variações genéticas deste gene com sua atuação sobre característica de ganho de peso, merecendo maiores estudos das alterações genéticas ocorridas neste gene frente a outras características quantitativas, tais como: rendimento de carcaça, resistência a doença, início da ovulação, entre outras. Alteração na seqüência de DNA, reflete na seqüência do RNA e das proteínas correspondentes. Foi encontrado neste trabalho os dois tipos principais de alterações, de mutação: mutações pontuais, onde somente um nucleotídeo é alterado e alterações que envolvem segmentos mais longos de DNA.

Algumas vezes, os efeitos fenotípicos das mutações pontuais são revertidos por uma segunda mutação, denominada mutação supressora. As mutações pontuais só tem efeito quando não ocorrem na terceira base, podendo ocorrer uma degeneração do código genético.

O significado evolutivo dos rearranjos cromossômicos está na capacidade de promover a variabilidade genética das populações e, a maioria destes rearranjos permanece nas populações sob a forma de polimorfismos, sem que haja o desenvolvimento de mecanismos de isolamento reprodutivo.

As alterações cromossômicas podem aumentar a variabilidade genética, tornando as espécies adaptadas a diferentes facetas do ambiente local.

As diversas literaturas consultadas demonstram que os estudos citogenéticos populacionais, do polimorfismo cromossômico, do polimorfismo bioquímico, de seqüenciamento de DNA, unidos aos estudos morfológicos, fisiológicos e ecológicos podem contribuir futuramente para a preservação das espécies e para uma maior evolução nos processos de melhoramento genético.



VIII Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Maringá, PR – 01 e 02 de julho de 2010

Melhoramento Animal no Brasil: UMA VISÃO CRÍTICA

Agradecimentos

A todos que contribuíram na execução deste trabalho, em especial ao meu orientador professor Dr. Ricardo Frederico Euclides.

Literatura citada

- FOTOUHI, N., KARATZAS, C.N., KUHNLEIN, U., ZADWORNÝ, D. Identification of growth hormone DNA polymorphism which respond to divergent selection for abdominal fat content in chickens. **Theoretical and Applied genetics**, v.85, p.931-936. 1993.
- GODDARD, A.D., COVELLO, R., LUOH, S.M. et al. Mutations of the growth hormone receptor in children with idiopathic short stature. **New England Journal of Medicine**, v.333, p.1093-1098. 1995.
- KUHNLEIN, U., NI, L., WEIGEND, S., GAVORA, J.S., FAIRFULL, W., ZADWORNÝ, D. DNA polymorphisms in the chicken growth hormone gene: response to selection for disease resistance and association with egg production. **Animal Genetics**, v.28, n.1, p.116-23, 1997.
- MOU L., LIU N., ZADWORNÝ D., CHALIFOUR L. e KUHNLEIN U. Presence of an additional *Pst I* fragment in intron 1 of the chicken growth hormone-encoding gene. **Gene** v.160, p.313-4, 1995.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2.ed., Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989, 626p.
- TANAKA, M., HOSOKAWA, Y., WATAHIKI, M., NAKASHIMA, K. Structure of the chicken growth hormone-encoding gene and its promoter region. **Gene** v.112, n.2, p. 235-9, 1992.