

X Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal
Uberaba, MG – 18 a 23 de agosto de 2013

Polimorfismos no gene *GHRL* e suas associações com características de interesse econômico em bovinos¹

Camila Urbano Braz², Gregório Miguel Ferreira de Camargo³, Diércles Francisco Cardoso³, Daniel Jordan de Abreu Santos³, Joslaine Noely dos Santos Gonçalves Cyrillo⁴, Humberto Tonhati⁵

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

²Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento Animal – FCAV/Unesp-Jaboticabal. e-mail: camila_urbano@yahoo.com.br

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

⁴Pesquisadora científica do Centro de Pesquisa em Pecuária de corte - Instituto de Zootecnia - Sertãozinho

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

Resumo: O hormônio da grelina é produzido pela parede do estômago e possui função orexígena, além de estimular a secreção do hormônio do crescimento e atuar no balanço energético. Dessa forma, pode ser considerado como gene candidato para identificação de marcadores genéticos relacionados com características de importância econômica em bovinos como aquelas ligadas à ingestão, crescimento e de carcaça. Objetivou-se estudar o gene do hormônio da grelina (*GHRL*) em 231 bovinos da raça Nelore, onde foram encontrados seis polimorfismos do tipo SNP no íntron 2 e 4 e no éxon 5. As posições dos SNPs no gene e as substituições, respectivamente foram: g.[1905A>G, 2068T>C, 4190T>C, 4269A>G, 4384T>C, 4450T>C] (número de acesso no Genbank: JX565585). Houve associações de SNPs com as características peso ao ano (P378), consumo de matéria seca (CMS), área de olho de lombo ao sobreano (AOLs) ($P \leq 0,05$) e espessura de gordura subcutânea no lombo (EGLa) e na garupa (EGGa) ao ano ($P \leq 0,05$), indicando que estes polimorfismos podem ser utilizados como auxílio à seleção em bovinos de corte.

Palavras-chave: *Bos taurus indicus*, cromossomo 22, intron, marcador molecular, SNP

Polymorphisms in the *GHRL* gene and their association with important economic traits in cattle.

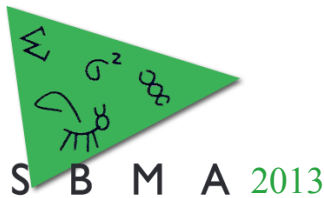
Abstract: The hormone ghrelin is produced by the stomach wall and has function to stimulate food intake, and stimulate the secretion of growth hormone and act on energy balance. Thus, it can be considered as candidate gene for identification of genetic markers associated with economically important traits in cattle as those related to intake, growth and carcass. The objective was to study the hormone ghrelin gene (*GHRL*) in 231 Nellore cattle, which were found six polymorphisms SNP in intron 2 and 4 and exon 5. The positions of SNPs in the gene and substitutions were respectively: g. [1905A>G 2068T>C, 4190T>C, 4269A>G, 4384T>C, 4450T>C] (Genbank accession number: JX565585). There were associations of SNPs with the characteristics male weight at 378 days of age (P378), dry matter intake (CMS), longissimus muscle area (AOLs) ($P \leq 0,05$), backfat thickness (EGL) and rump fat thickness croup (EGG) ($P \leq 0,05$), indicating that these polymorphisms can be used as an aid to selection in beef cattle.

Keywords: *Bos taurus indicus*, chromosome 22, intron, molecular marker, SNP

Introdução

A seleção para características de interesse econômico por meio de programas de melhoramento genético adequados permite o aumento dos índices produtivos. Nesse contexto, graças ao acelerado desenvolvimento tecnológico surgiram as biotecnologias, as quais acopladas ao melhoramento genético ganharam crescente posição de destaque nos sistemas de produção de bovinos (Coutinho et al., 2010). Uma dessas biotecnologias é a utilização de marcadores moleculares assistindo a seleção de características de interesse econômico, a qual pode aumentar a acurácia, diminuir o intervalo de gerações e assim, aumentar o ganho genético.

O gene do hormônio da grelina é um gene candidato para identificação de marcadores moleculares, pois esse hormônio induz a ingestão alimentar, a secreção de GH (hormônio do crescimento) e a adiposidade (Ukkola et al., 2002; Martinelli et al., 2008). Tal gene está localizado no



X Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Uberaba, MG – 18 a 23 de agosto de 2013

cromossomo 22 e de acordo com Colinet et al. (2009), o gene *GHRL* em bovinos é composto de 5 éxons e 4 introns, sendo que os éxons 1, 2, 3, 4 e 5 possuem comprimentos de 21 pb, 134 pb, 114 pb, 109 pb e 154 pb, respectivamente e a região codificadora compreende os éxons 2, 3, 4 e 5 (parcialmente).

Assim, objetivou-se verificar a existência de polimorfismos em regiões do gene da Grelina (*GHRL*) e avaliar a associação destes polimorfismos com características de crescimento, eficiência alimentar e carcaça em bovinos da raça Nelore.

Material e Métodos

Os animais utilizados nesse estudo pertencem ao Centro APTA Bovinos de Corte do Instituto de Zootecnia em Sertãozinho-SP. Foram coletados folículos pilosos de 231 animais (110 fêmeas e 121 machos) nascidos nos anos de 2009 e 2010, pertencentes à linha de seleção Nelore Tradicional.

O DNA foi extraído de amostras de pelo de acordo com o método de Fenol-Cloroformio-Álcool Isoamínico e para a realização da PCR foram utilizados dois pares de *primers*, I3 (F: TGCATTGCCAGGTGGGTTCTCTAC R: AGAATCTGCAGGCCGCGTGAAGT), o qual amplificou uma região de 409 pb que abrange uma parte do íntron 3 e E5 (F: GGGAGGAGAGCAGACACAGT R: TGACCACAGACCAGGAATTG) que amplificou uma região de 437 pb que compreendia uma parte do íntron 4 e o éxon 5, sendo que este último incluía uma região 3'UTR. A programação utilizada foi: desnaturação a 95°C por 5 min, seguido por 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 min, pareamento a 63,4°C e 63,3°C para o I3 e E5, respectivamente, por 1 min, extensão a 72°C por 1 min e extensão final a 72°C por 5 min.

Os produtos de PCR foram sequenciados a partir dos *primers* utilizando a técnica de terminação de cadeia por dideoxinucleotídeos (ddNTPs). Para a análise e identificação dos polimorfismos, as sequências obtidas foram analisadas através do programa CodonCode Aligner.

As características de interesse econômico analisadas foram o peso ao ano padronizado aos 378 dias de idade para machos (P378) e ao sobreano padronizado aos 550 dias de idade para fêmeas (P550), consumo de matéria seca (CMS), consumo alimentar residual (CAR) e área de olho de lombo, espessuras de gordura subcutânea no lombo e na garupa ao ano e ao sobreano (AOLa, AOLs, EGLa, EGLs, EGGa, EGGs, respectivamente).

O consumo de matéria seca foi determinado pela média do consumo no período do teste do CAR, em kg/dia. O consumo alimentar residual, em kgMS/dia, foi calculado como a diferença entre o consumo de matéria seca observado ao longo do período experimental e o predito a partir de equação de regressão múltipla, considerando o GMD (gamo médio diário) e $PV^{0,75}$ (peso metabólico) como covariáveis. Foi utilizada a técnica de ultrassonografia para a obtenção das características AOL e EGL, ambas mensuradas entre a 12ª e a 13ª costelas no músculo *Longissimus dorsi* e EGG medida entre os músculos *Gluteus medius* e *Biceps femoris*, localizados entre o flió e o ísquio.

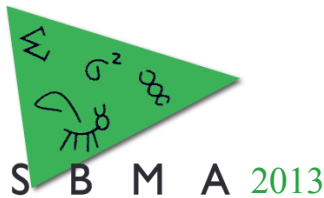
O desequilíbrio de ligação (r^2) entre os SNPs foi estimado com o uso do programa computacional Plink com o objetivo de verificar quais os SNPs que segregam juntos. As análises estatísticas foram realizadas utilizando modelos lineares generalizados através do aplicativo PROC MIXED do pacote estatístico do SAS 9.2. O modelo estatístico foi composto de efeitos fixos do grupo de contemporâneo (formado por ano de nascimento, mês de nascimento e sexo) e dos seis SNPs encontrados, efeito aleatório do touro e como covariáveis a idade da vaca e do animal.

O teste F foi utilizado no estudo do efeito dos polimorfismos para todas as características, considerando valores de $P \leq 0,05$ como sendo significativos, com posterior aplicação do teste de Bonferroni.

Resultados e Discussão

Foram identificados seis polimorfismos do tipo SNP nas regiões analisadas, sendo que dois polimorfismos estão na região do íntron três (g.[1905A>G e 2068T>C]). Os SNPs g.[4190T>C e 4269A>G] estão localizados no íntron quatro e os SNPs g.[4384T>C e 4450T>C] estão no éxon cinco em região 3'UTR.

As frequências alélicas e genotípicas foram calculadas e a fim de se observar se os SNPs segregavam juntos fez-se o desequilíbrio de ligação. Os SNPs g.[1905A>G, 4190T>C e 4384T>C] estavam em desequilíbrio de ligação, assim provavelmente são herdados juntos e elegeu-se o SNP



g.4384T>C para representar o grupo por possuir as melhores frequências genotípicas. Assim, os SNPs g.[2068T>C, 4269A>G, 4384T>C e 4450T>C] foram utilizados para a análise de associação com os valores fenotípicos das características analisadas. Houve associações do SNP g.2068T>C com as características CMS, AOLs e P378 e do SNP g.4384T>C com a característica EGGa ($P \leq 0,05$).

Sherman et al. (2007) encontraram um SNP no gene bovino *GHRL* associado com características de ingestão e conversão alimentar, semelhante ao encontrado no presente estudo. Wojtysiak & Kaczor (2011) demonstraram associações de polimorfismos do gene *GHRL* com peso de carcaça, peso do pernil, peso do lombo, área de olho de lombo, gordura abdominal e espessura de gordura subcutânea. Esses resultados corroboram com as associações encontradas para AOLs e EGGa nesse estudo.

Sugere-se que estudos futuros sejam realizados com o intuito de verificar a implicação das regiões não-codificantes do DNA com características de interesse econômico.

Conclusões

Foram identificados polimorfismos no gene do hormônio da grelina (*GHRL*) e associações desses polimorfismos com peso ao sobreano para machos, consumo de matéria seca, espessura de gordura subcutânea na garupa ao ano e área de olho de lombo ao sobreano. Dessa forma, o gene do hormônio da grelina pode ser um importante candidato para identificar variações genéticas que influenciam em características de importância econômica.

Literatura citada

- COLINET, F.G; PORTETELLE, D.; RENAUVILLE, R. Molecular characterization of the bovine *GHRL* gene. **Archiv Tierzucht**, v.52, p.79-84, 2009.
- COUTINHO, L.; ROSARIO, M.F.; JORGE, E.C. Biotecnologia animal. **Estudos Avançados**, v.24, n.70, 2010. Available at: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-40142010000300009&lng=en&nrm=iso>. Accessed on: Aug. 04, 2013.
- 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.; NKRUMAH, 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.
- UKKOLA, O; POYKOO, S. Ghrelin. Growth and obesity. **Annal of Medicine**, v.34, p.102-108, 2002.
- WOJTYSIAK, D. & KACZOR, U. Effect of polymorphisms at the ghrelin gene locus on carcass, microstructure and physicochemical properties of longissimus lumborum muscle of Polish Landrace pigs. **Meat Science**, v.89, p.514-18, 2011.