

Ana Paula Del Vesco<sup>1</sup>,  
Eliane Gasparino<sup>2</sup>,  
Maria Amélia Menck Soares<sup>3</sup>,  
Carlos Antonio Lopes de Oliveira<sup>2</sup>,  
Simara Márcia Marcato<sup>2</sup>  
Débora Sommer Marques<sup>1</sup>

---

**SEQUENCIAMENTO DO EXON I DO  
GENE DO HORMÔNIO DO  
CRESCIMENTO (GH) EM CODORNA**

**RESUMO:** O hormônio do crescimento (GH) é um hormônio sintetizado e secretado pela hipófise e está envolvido em uma série de processos fisiológicos importantes. Há relatos de polimorfismo no gene GH e associado com a produção de leite, ovos, carne, além de algumas características relacionadas à reprodução. Neste estudo, foi observada alta homologia entre o fragmento seqüenciado em uma linhagem de codorna de corte e os fragmentos depositados no GenBank, sendo verificadas mutações pontuais como transversões e transições, além de deleções e inserções de bases. No *exon I*, na região 5'UTR, foram observados polimorfismos que podem ser utilizados em estudo de associação com características de interesse econômico.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Coturnix japonica*, sequência sinal, região 5'UTR.

**EXON I SEQUENCING OF GROWTH HORMONE GENE IN QUAILS**

**SUMMARY:** Growth hormone (GH), a synthesized hormone secreted by the hypophysis, is involved in several important physiological processes. Research has revealed polymorphism in the gene and its association with traits such as milk, egg and meat production coupled to certain characteristics referring to reproduction. High homology between the fragment sequenced in a meat quail strain and fragments deposited in the GeneBank, with specific mutations such as transversions, transitions, deletions and base insertions, has been registered. Polymorphisms in *exon I* within the 5'UTR region have been reported

---

Data de recebimento: 19/08/09. Data de aceite para publicação: 28/09/09.

<sup>1</sup> Aluna de pós-graduação do curso de Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá - Paraná, Brasil.

<sup>2</sup> Professores do curso de Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá - Paraná, Brasil.

<sup>3</sup> Professora do Departamento de Genética da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro - Brasil.

to may be employed in studies associated to traits of economic interest.

**KEYWORDS:** *Coturnix japonica*, signal sequence, region 5'UTR.

## INTRODUÇÃO

O crescimento da coturnicultura no Brasil, segundo Furlan *et al.* (1998), vem despertando a atenção de pesquisadores da área, no sentido de desenvolver trabalhos que venham a contribuir para um maior aprimoramento e fixação dessa cultura como fonte rentável na produção avícola.

As codornas são animais pertencentes à ordem das Galináceas, família das Faisámidas, gênero *Coturnix*; possuem altos índices de produtividade, rápido crescimento, pequeno porte, facilmente manipuláveis, ciclo reprodutivo curto e postura regular. Todas essas vantagens fazem da codorna um animal muito utilizado como modelo experimental para as aves domésticas em pesquisas laboratoriais (OLIVEIRA, 2002).

No Brasil, a criação de codorna vem crescendo, de maneira considerável, desde a sua implantação como atividade avícola econômica. A razão deste sucesso é plenamente justificável pela qualidade excepcional de sua carne, alto valor nutritivo e agradável sabor de seu ovo, o que tem resultado em boa aceitação no mercado consumidor. Pesquisas indicam que a carne de codorna é excelente fonte de vitamina B6, niacina, B1, B2, ácido pantotênico, bem como ácidos graxos. O ovo da codorna tem excelente valor nutritivo, rico em vitaminas do complexo B, Vitamina A, vitamina D, além de minerais como ferro, cálcio, manganês e cobre.

Contudo, essa expansão tem encontrado barreiras que por vezes inviabilizam a exploração econômica. Uma dessas barreiras é a falta de material genético que garanta o potencial de produção, esse obstáculo pode ser transposto com a ajuda do melhoramento genético.

Pontos importantes para um programa de melhoramento genético de sucesso é a seleção de genótipos superiores em uma população segregante. Uma importante ferramenta para a detecção destes genótipos são os marcadores moleculares.

A maioria das características quantitativas é determinada por muitos genes, cada um deles com pequeno efeito. Entretanto, alguns desses genes podem ter mais importância no controle de determinada característica fenotípica. Neste caso, é possível identificar um gene principal (gene candidato), por meio da utilização de técnicas moleculares que permitem a identificação direta de polimorfismos

genéticos na estrutura gênica destes genes de grande efeito. Esses polimorfismos são ditos como marcadores moleculares e é possível para cada gene candidato ter um ou mais marcadores que podem ser utilizados para identificação do genótipo, correlacionando o mesmo com o fenótipo desejado (FEDERIZZE, 1998). A identificação e uso de marcadores moleculares vêm recebendo grande atenção por parte dos pesquisadores.

O reconhecimento de ligação entre efeitos gênicos e segmentos cromossômicos que apresentam herança mendeliana é necessário pois podem aumentar a acurácia na determinação de valores genéticos e tornar mais eficiente a manipulação genética de características que não são diretamente medidas, tais como resistência a doenças, característica de carcaça, características limitadas pelo sexo e de baixa herdabilidade (ROCHA *et al.*, 1992). Assim a seleção assistida por marcadores poderá reduzir o tempo de identificação de genótipos superiores e aumentar a intensidade de seleção (COUTINHO & REGITANO, 1995).

O hormônio do crescimento (GH) é um hormônio protéico, composto por 191 aminoácidos e secretado pela hipófise; este hormônio afeta diretamente vários parâmetros fisiológicos, tais como, crescimento, produção de ovos e reprodução (STEPHEN *et al.*, 2001). A estrutura genômica do gene do GH tem sido estudada em diferentes animais e sua estrutura tem se mostrado bastante similar entre as espécies.

Em frangos, o gene do hormônio do crescimento (GH) foi primeiramente isolado e seqüenciado por Lambet *et al.* (1998), e a partir de então, vários outros autores estudaram amplamente este gene. Em 1992, Tanaka *et al.* clonaram e sequenciaram o gene GH em galinhas (*Gallus gallus*), e concluíram que o mesmo possuía tamanho aproximado de 4100 pares de base (pb) e era composto por 5 éxons e 4 íntrons. Entretanto, o tamanho do gene GH era significativamente maior que o gene análogo em mamíferos, isto devido ao tamanho dos íntrons, os quais eram bem maiores.

Em 1995, Tanaka *et al.* encontraram um fragmento adicional de 197 pb localizados no íntron 1. Corroborando os resultados encontrados por esses autores, MOU (1995) também sequenciou o gene GH e encontrou o mesmo fragmento adicional na posição +308 no íntron 1. Outros autores também encontraram polimorfismos neste gene, Fotouhi *et al.* (1993) identificaram 4 sítios RFLPs, 1 para *Sac I* e 3 para *Msp I*, estes últimos localizados nos íntrons 1, 2 e 4 respectivamente. Nie *et al.* (2002), detectaram uma deleção de 50 pb no íntron 4 em

frangos nativos chineses. Nie *et al.* (2005) identificaram 46 SNPs (Single Nucleotide Polymorphism), sendo que 36 dos 46 estavam localizados no íntron.

O gene do hormônio do crescimento (GH) da galinha é composto de cinco *exons* intercalados por quatro *introns*; similar à organização do GH de mamíferos. Por apresentar forte influência sobre o crescimento, composição corporal, produção de ovos, leite e reprodução, tem despertado grande interesse para o estudo de polimorfismos do gene que codifica este hormônio.

Alguns estudos de polimorfismos do GH vêm sendo desenvolvidos no sentido de identificar alterações na seqüência de nucleotídeos que possam levar à variação na expressão final do hormônio.

No presente estudo, a região do *exon I* do gene do GH de codorna (*Coturnix japonica*), selecionada para produção de carne, foi seqüenciada e comparada com a coleção de nucleotídeos depositada no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), com o objetivo de verificar o grau de homologia entre as seqüências e buscar por regiões menos conservadas, susceptíveis a polimorfismos.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas quatro codornas (*Coturnix japonica*) de uma linhagem selecionada para produção de carne para obtenção de amostras de DNA a partir de células sanguíneas. As aves foram mantidas pela Universidade Estadual de Maringá, na Fazenda Experimental de Iguatemi.

As amostras de DNA, extraídas por punção venosa, foram coletadas diretamente em tubos heparinizados e estéreis, aproximadamente 0,5 mL de sangue de cada animal. Após a coleta, as amostras foram resfriadas a 4°C e armazenadas no Laboratório de Reprodução/Genética Molecular da Universidade Estadual de Maringá até o momento da extração.

O DNA foi extraído de acordo com Sambrook *et al.* (1989), com modificações. O DNA genômico foi obtido das células sanguíneas pela adição de 500  $\mu$ L de tampão contendo cetyl trimethylammonium bromide (CTAB) em tubos de 1,5 mL. As amostras foram mantidas por uma hora em banho-maria a 65°C com agitações ocasionais. Em seguida, o DNA extraído foi deixado à temperatura ambiente por alguns minutos para resfriamento, quando foram adicionados 500  $\mu$ L de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1) acompanhado por agitação. Após a centrifugação por 15 minutos à 1.3000 g, o sobrenadante foi transferido e precipitado

com a adição de 250  $\mu$ L de isopropanol, seguido por resfriamento a 4°C durante 30 minutos. O DNA precipitado foi centrifugado à 1.3000 g por 30 min. O pellet foi então lavado por duas vezes em etanol 75% e, após evaporação, o DNA foi dissolvido em tampão TE (Tris-HCL 10mM, pH 7,4 e EDTA 1mM, pH 8) e quantificado á 260 nm e 280 nm.

Para o estudo do gene do GH em codorna foi utilizado como modelo os dados moleculares obtidos com o estudo de aves comerciais. Para análise do *exon I* e parte dos *introns* flanqueadores do gene do hormônio de crescimento em codornas foi utilizado como referência a sequência depositada no GenBank, sob número de acesso D10484 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Os fragmentos de DNA foram amplificados por PCR por um programa de amplificação proposto por KUHNLEIN *et al.* (1997) e pares de oligonucleotídeos 5'-ATCCCCAGGCAAACATCCTC-3' e 5'-CCTCGACATCCAGCTCACAT-3' desenhados pelos mesmos autores. O sistema de amplificação foi composto de 0,85  $\mu$ M de primers, 0,3 mM de dNTPs, 1 unidade de *Taq* DNA polimerase, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, água ultrapura e DNA genômico, em volume final de 15  $\mu$ L. O programa de amplificação utilizado foi de desnaturação inicial a 94°C por dois minutos; 35 ciclos, de 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 63°C e 45 segundo a 72°C; e um passo final de extensão a 72°C por sete minutos.

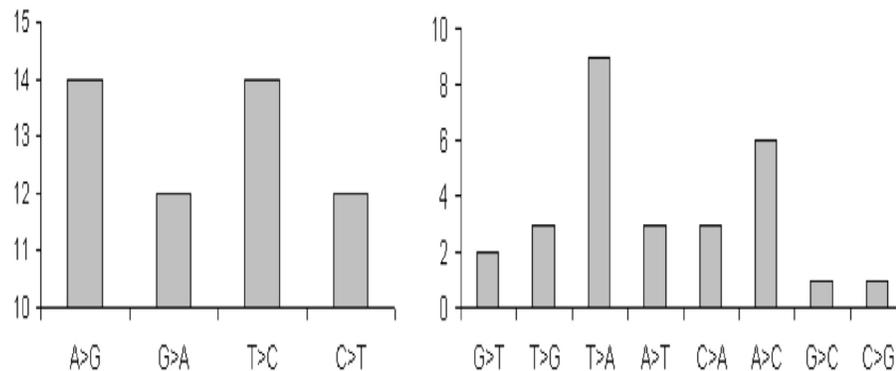
Os fragmentos de DNA adequadamente amplificados foram purificados (Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System – PROMEGA – Madison, WI, USA) e seqüenciados, pelo seqüenciador automático (MegaBACE 1000 Amersham Life Science – USA), usando-se o DYEnamic ET Dye Terminator Kit (GE Healthcare, USA). As seqüências geradas foram comparadas com a seqüência depositada no GenBank, utilizando-se o programa Clustal W, disponível na internet no endereço [www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2](http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um fragmento de tamanho esperado foi obtido por amplificação do DNA de codorna e com *primers* especificamente desenhados para amplificar o *exon 1* e parte do *intron 1* e 2 do gene do hormônio do crescimento (GH) de galinha. O fragmento obtido apresentou tamanho aproximado de 780 pb, como predito para a seqüência de *Gallus gallus*. Após a determinação da seqüência de nucleotídeos, um fragmento de 704 pb pôde ser corretamente editado e depositado no Genebank sob o número de acesso EU515189.

As seqüências obtidas foram comparadas com a coleção de nucleotídeos do GeneBank, utilizando-se do algoritmo BLAST (Basic

Local Alignment Search Tool), uma ferramenta de busca e alinhamento de sequência (ALTSCHUL *et al.*, 1997), que foi utilizada para verificar se as seqüências apresentavam homologia com a seqüência do GH dos bancos de dados. Um pareamento estatisticamente significativo sugere forte compartilhamento de propriedades químicas ou estruturais, confirmando assim se tratar realmente do gene estudado. Foi encontrada 89% de homologia entre as seqüências de *Gallus gallus* (EF452679, EF472953, EF472954 e AY461843) e da codorna. Foram observadas três inserções de uma única base (>C, >T, >G) e duas inserções de duas bases (>TA, >CC). As deleções ocorreram em maior número variando de uma [3x(<A), <G, <C)] até 12 bases (<TT, <CTAAT, <TGTGGCAACTTA). Entre as 80 substituições observadas, as transições foram as mais abundantes (65%) (Figura 1). De acordo com GOJOBORI *et al.* (1982), transições parecem ser mais freqüentes que transversões. Especificamente no *exon* I foram observadas sete alterações, sendo cinco transições [2x(C>T), (T>C), (G>A), (A>G)], uma transversão (C>A) e uma deleção (<G).



**Figura 1** Frequência de substituições na seqüência do GH de codorna considerando as referências: EF452679, EF472953, EF472954 e AY461843, (a) transições e (b) transversões.

As regiões menos conservadas, identificadas na região 5'UTR, para a linhagem de codorna utilizada neste estudo, podem ser úteis para estudos de associação, visto que em bovino um polimorfismo observado nesta região foi correlacionado significativamente com rendimento de carcaça (CHEONG *et al.*, 2006). KUHNLEIN *et al.* (1997), analisando o GH em doze linhagens de galinhas Leghorn branca selecionadas para produção de ovos e resistência à doença de Marek, sugeriram que os alelos encontrados, cujas variações estavam localizadas nos *introns*, estavam associados à produção de ovos. Em



## CONCLUSÃO

As mutações pontuais observadas no *exon I* podem ser exploradas, em estudos futuros como regiões passíveis de polimorfismos em codornas, uma vez que, em outras espécies, foram encontrados polimorfismos nesta mesma região, associados com características de produção.

## REFERÊNCIAS

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, p. 3389-3402, 1997.

CHEONG, H. S.; YOON, D. H.; KIM, L. H.; PARK, B. L.; CHOI, Y. H.; CHUNG, E. R.; CHO, Y. M.; PARK, E. W.; CHEONG, I. C.; OH, S. J.; YI, S. G.; PARK, T.; SHIN, H. D. Growth hormone-releasing hormone (GHRH) polymorphisms associated with carcass traits of meat in Korean cattle. **BMC Genetics**, Londres, v. 7, p. 7-35, 2006.

COUTINHO, L.L.; REGITANO, L.C.A. O uso de marcadores moleculares na indústria animal. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO, 1, 1995, Belo Horizonte. **Anais ...** Belo Horizonte: CBRA, 1995. P. 195-205.

FARIA, D.A.; GUIMARÃES, S.E.F.; LOPES, P.S.; SOLLERO, B.P.; WENCESLAU, A.A.; PIRES, A.V.; PAIVA, S.R.; COUTINHO, L.L.; PEIXOTO, J.O.; PAIXÃO, D.M. Polimorfismo no gene do hormônio do crescimento associado a características quantitativas em suínos comerciais e nativos. IN: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41, 2004, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande, 2004. CD rom.

FEDERIZZI, L.C. Estrutura de um programa de melhoramento de plantas e possíveis aplicações de marcadores moleculares: visão do melhorista. In: MILACH S.C.K. (Ed.). **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre, 1998, p. 3-15.

FOTOUHI, N.; KARATZAS, C. N.; KUHNLEIN, U.; ZADWORNÝ, D. Identification of growth hormone DNA polymorphisms which respond to divergent selection for abdominal fat content in chickens. **Theoretical Applied Genetics**, Stuttgart, v. 85, p. 931-936, 1993.

FURLAN, A. C.; ANDREOTTI, M. O.; MURAKAMI, A. E. Valores

energéticos de alguns alimentos determinados com codornas japonesas (*Coturnix coturnix japonica*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 27, n. 6, p. 1147-1150, 1998.

GOJOBORI, T.; LI, W. H.; GRAUER, D. Patterns of nucleotide substitution in pseudogenes add functional genes. **Journal of Molecular Evolution**, Nova Yorque, v. 18, p. 360-369, 1982.

KUHNLEIN, U.; NI, L.; ZADWORN, D. DNA polymorphisms in the chicken growth hormone gene: Response selection for disease resistance and association with egg production. **Animal Genetics**, Jouy-en-josas, v.28, p.116-123, 1997.

LAGZIEL, A.; LIPKIN, E.; EZRA, E.; SOLLER, M. I. J. An MspI polymorphism at the bovine growth hormone (bGH) gene is linked to a locus affecting milk protein percentage. **Animal Genetics**, Jouy-en-josas, v. 30, p. 296-299, 1999 .

LECHNIAK, D.; SWITONSKI, M. Aneuploidy in bovine oocytes matured in vitro. **Chromosome Research**, Dordrecht, v.6, p.504-505, 1998.

LAMB, L. C.; GALEHOUSE, D. M.; FOSTER, D. N. Chicken growth hormone cDNA sequence. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 16, p. 9339, 1988.

MOU, L.; LIU, N.; ZADWORN, D.; CHALIFOUR, L. Presence of an additional PstI fragment in intron 1 of the intron 1 of the chicken growth hormone-encoding gene. **Gene**, Louisiana, v. 160, p. 313-314, 1995.

NIE, Q.; IP, S. C. Y.; ZHANG, X. New variations in intron 4 of growth hormone gene in Chinese native chickens. **Journal of Heredity**, Oxford, v. 93, p. 277-279, 2002.

NIE, Q.; SUN, B.;ZHANG, D. High diversity of the chicken growth hormone gene and effects on growth and carcass traits. **Journal of Heredity**, Oxford, v. 96, n. 6, p. 698-703, 2005.

OLIVEIRA, B.L. Manejo racional e produtividade das codornas. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL E COTURNICULTURA, 01, 2002, Lavras. **Anais...** Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2002. p. 77-84.

ROCHA, J. L.; BAKER, J. F.; WOMACK, J. E. Statistical associations between restriction fragment lenght polymorphisms and quantitative traits in beef cattle. **Journal Animal Science**, Urbana, v. 70, p. 3360-3370, 1992.

SAMBROOK, J.; FRITSCK, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratorial manual**. 2. ed. Nova Yorque: Cold Spring Harbor Laboratory

Press, 1989.1659 p.

STEPHEN, C. Y.; ZHANG X.; FREDERICK C. L. Genomic growth hormone gene polymorphism in native Chinese chickens. **Experimental Biology and Medicine**, Stanford, p.458-462, 2001.

THAKUR, M. S.; PARMAR, S. N. S.; CHAUDHARI, M. V.; BHARDWAJ, J. K. Growth hormone gene polymorphism and its association with egg production in Kadaknath chicken. Agosto de 2009. *Livestock Research for Rural Development*, v.21, n.8. Disponível em: <http://www.lrrd.org/lrrd21/8/thak21132.htm>. Acesso em: 12 maio 2010.

TANAKA, M.; HOSOKAMA, Y.; WATAHIKI, M. Structure of the chicken growth hormone – encoding gene and its promoter region. **Gene**, Louisiana, v. 112, p. 235-239, 1992.

TANAKA, M.; NAKASHIMA, K. The structure of intron 1 in the chicken growth hormone-encoding gene. **Gene**, Louisiana, v. 160, n. 2, p. 315, 1995.

UNANIAN, M. M; BARRETO, C. C.; FREITAS, A. R.; COREDIRO, C. M. T.; JOSAKIAN, L. A. Associação do polimorfismo do gene do hormônio de crescimento com a característica peso em bovinos da raça Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 29, n. 5, p. 1380-1386, 2000