

SEQÜENCIAMENTO E ANÁLISE DOS GENES DAS SUBUNIDADES ALFA E BETA DO HORMÔNIO FOLÍCULO ESTIMULANTE DE BOVINO (*Bos taurus indicus*)

ÂNGELA PATRÍCIA SANTANA,¹ LIDIA PEPE MORAES,² LUCI SAYORI MURATA² E FERNANDO ARARIPE TORRES³

1. Universidade de Brasília. Contato principal para correspondência.

2. Universidade de Brasília

3. Universidade de Brasília.

RESUMO

Este trabalho relata uma clonagem e seqüenciamento das subunidades alfa e beta do hormônio folículo estimulante de *Bos taurus indicus*. Também apresenta os resultados de comparação realizada das seqüências gênicas dessas cadeias com as seqüências das cadeias alfa e beta do FSH de suínos e da cadeia beta de bovinos *Bos taurus taurus* já presentes no GenBank. Na comparação das seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos predita da cadeia α FSH de *Bos taurus indicus* com as cadeias α FSH de outras espécies como suínos e búfalo (*Bubalis bubalis*), observou-se que as seqüências são bastante similares. A comparação da seqüência da subunidade α FSH de *Bos taurus indicus* com a de suíno demonstrou diferenças em três resíduos de aminoácidos. Na comparação com β FSH, registrou-se modificação na primeira base do *codon* que

levou à alteração no resíduo do aminoácido 83, que, em *Bos taurus indicus*, é uma glicina, ao invés da serina presente em *Bos taurus taurus*. Confirmaram-se essa modificação e todas as outras identificadas na seqüência dos cDNA das cadeias α FSH e β FSH em outra clonagem. A modificação Ser para Gly na posição 83 foi a única que alterou a identidade do resíduo de aminoácido na comparação entre as subunidades beta do FSH de *Bos taurus indicus* e *Bos taurus taurus*. Contudo, ela não deve alterar significativamente as propriedades fisiológicas do FSH, uma vez que o resíduo de glicina encontrado nessa posição também é encontrado na cadeia β FSH suína. Trata-se, portanto, de uma modificação particular que distingue as cadeias β FSH de *B. taurus taurus* e *B. taurus indicus*.

PALAVRAS-CHAVES: Bovino, clonagem, FSH, hormônio.

ABSTRACT

SEQUENCING AND ANALYSIS OF SUBUNITS ALPHA AND BETA OF THE FOLLICLE STIMULATING HORMONE FROM BOVINE (*Bos taurus indicus*)

The aim this work was to promote the cloning and analysis sequencing of the subunits alpha and beta of the *Bos taurus indicus* follicle stimulated hormone (FSH). It to compare the results of sequencing these subunits between subunits alpha and beta from swine and *Bos taurus taurus* previously published in GenBank. There was a high similarity between nucleotides and predicted amino acids in the α FSH chain of *Bos taurus indicus* and those of swine and buffalo. In the compare the sequence of the

subunit of α FSH of *Bos taurus indicus* with swine showed differences in three aminoacid residues with β FSH there was a modification in the first base of the codon, which had to an alteration in the 83 amino acid residue which in *Bos taurus indicus* and a glycine, this was serine in *Bos taurus taurus*. This modification, as well as those indentified in cDNA of the α FSH and β FSH chains were confirmed by cloning. The modification of serine for glycine in position 83 was the only substitute that altered the residue in the comparson between

β FSH subunit of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus*. Nevertheless this modification should not significantly alter the physiological properties of FSH as the glycine residue

KEY WORDS: Bovine, cloning, FSH, hormone.

INTRODUÇÃO

Uma das técnicas mais empregadas para a promoção da melhoria genética dos rebanhos bovinos é a transferência de embriões, que consiste na indução de superovulação em uma vaca doadora, uma maturação de vários folículos ovarianos sob a influência do hormônio folículo estimulante (FSH), como registra PEREIRA (1999). De acordo com esse autor, uma das dificuldades da realização da técnica no Brasil é a dependência de importação do hormônio folículo estimulante para a promoção da superovulação. Outra dificuldade ainda é o fato de haver variação na resposta à superovulação e no desenvolvimento de imunoglobulinas anti-FSH. Trata-se, portanto, de dosagem dependente e que limita também o uso repetido de vacas doadoras.

O hormônio folículo estimulante (FSH) é um dos componentes da família dos hormônios glicoprotéicos da hipófise, dos hormônios da gonadotrofina coriônica (CG), do hormônio luteinizante (LH) e do hormônio tireotrófico (TSH). Esses hormônios são elementos-chave na fertilidade humana e dos animais. São heterodímeros, cada um contendo em comum a subunidade α (92 resíduos de aminoácidos) e uma única subunidade específica β (111 resíduos de aminoácidos no FSH) (FOX et al., 2001). As subunidades se unem por interações não-covalentes: a subunidade α é idêntica para os três hormônios glicoprotéicos (FSH, LH e TSH), enquanto que as subunidades β é que são distintas para cada hormônio, sendo responsáveis pela interação específica com o receptor do FSH (DICKSON, 1996).

O FSH é produzido na glândula hipófise, na porção anterior desta (adenohipófise). A atividade adenohipofisária é controlada pelos hormônios liberadores hipotalâmicos. Eles são liberados dentro do sistema porta hipofisário, que co-

was also found in the swine β FSH, it is therefore a specific modification which distinguishes between the β FSH of *Bos taurus taurus* and *Bos taurus indicus*.

necta o hipotálamo à glândula hipófise anterior (CUNNINGHAM, 2004).

Segundo NORMAN & LITWACK (1997), o tamanho do gene que codifica a cadeia β (β FSH) do FSH humano é de 4.9 kb e está localizado no cromossomo 1. Esse gene contém três éxons e dois íntrons. O gene que codifica para a cadeia α (α FSH) está localizado no cromossomo 6 e tem 13.5 kb de comprimento, com quatro éxons e três íntrons.

Os genes que codificam as cadeias α FSH e β FSH de bovinos (*Bos taurus*) já foram clonados (ERWIN et al., 1983; MAURER & BECK, 1986; KIM et al., 1987). A cadeia β FSH madura apresenta 109 resíduos de aminoácidos e a cadeia α FSH bovina 96 resíduos de aminoácidos (ERWIN et al., 1983). De acordo com STABENFELDT & EDQVIST (1996), a principal função do FSH na fêmea é promover o crescimento dos folículos, mediante sua atuação nas células da granulosa.

Uma vez que o Brasil possui o maior rebanho bovino comercial do mundo, principalmente voltado para a produção de carne, e apresenta baixos índices de produtividade, quando comparada aos países mais desenvolvidos, este trabalho propôs-se a promover a clonagem e sequenciamento do hormônio folículo estimulante de *Bos taurus indicus*, de uma raça zebuína com perfil para produção de carne, cujo rebanho é predominante no país e em países de clima tropical. Visam-se posteriores construções de sistemas de expressão recombinante desse hormônio, para beneficiar os procedimentos de fecundação *in vitro* e transferências de embriões, reduzindo, portanto, a dependência da importação de extratos hipofisários de suínos, tradicionalmente utilizados para induzir a superovulação nos bovinos. Com isso eliminam-se os inconvenientes de esse extrato não ser espécie-específico, causando

dosagem-dependência desse produto, em virtude da resposta imune que provoca no organismo animal. Além disso, promove-se a comparação das seqüências gênicas das cadeias alfa e beta com as seqüências alfa e beta do FSH de suínos e da cadeia beta de bovinos *Bos taurus taurus* já presentes no GenBank.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta e preparo das amostras

Nos trabalhos de extração de RNA de hipófise de bovino *Bos taurus indicus*, todos os reagentes e a água utilizados para isso estavam em condições *RNAase free* (livre de RNAases). Para isso, os materiais plásticos foram tratados com solução de dietil pirocarbonato (DEP) e todas as vidrarias utilizadas no experimento permaneceram por doze horas em estufa com calor seco sob temperatura de 180° C. Coletaram-se as hipófises de bovinos em abatedouros frigoríficos, imediatamente após o abate de cada animal, acondicionando-as em papel alumínio *RNAase free* e mantendo-se-as sob temperatura de aproximadamente -196°C. Os protocolos e procedimentos utilizados neste trabalho, em sua maioria, seguem as técnicas presentes no manu-

al para laboratório descrito por SAMBROOK et al., (1989). Utilizaram-se as linhagens celulares DH5 α e XL1 Blue (SAMBROOK et al. 2001). Os plasmídeos empregados para clonagem e seqüenciamento de produtos de PCR foram o pGEM-T, comercializado pela Promega,¹ e o vetor pBluescript II KS, produzido pela StratageneTM.

Oligonucleotídeos utilizados

Os oligonucleotídeos (*primers*) utilizados para a amplificação das seqüências gênicas das cadeias α FSH e β FSH de *Bos taurus indicus* foram desenhados a partir das seqüências dos genes de *Bos taurus taurus* previamente descritos (ESCH et al., 1986; MAURER & BECK, 1986) e disponíveis no banco de genes internacional (GeneBank – www.ncbi.nlm.nih.gov) com número de acesso M13383. No Quadro 1 estão descritos o número, as seqüências do oligonucleotídeo (*primer*) bem como a temperatura e a região de anelamento (sublinhado), além dos respectivos sítios para enzimas de restrição presentes.

1 Promega® – Corporation – pGEM-T Easy Vector Systems.

QUADRO 1. *Primers* utilizados (as regiões sublinhadas são complementares aos genes α FSH ou β FSH; os sítios de restrição estão em negrito).

Código numérico <i>primer</i>	Seqüência	Tm	Sítio
(1) BetaN	5' CGGAATTC <u>TGCGAGCTGACCAACATCACC</u>	61°C	<i>Eco</i> RI
(2) BetaC	5' CGGAATTC <u>TTATTCTTTGATTTCCCTGAAGG</u>	59°C	<i>Eco</i> RI
(3) BetaNot	5' CGGCGGCCG <u>CCTTATTCTTTGATTTCCC</u>	39°C	<i>Not</i> I
(4) AlfaN	5' CGGAATTC <u>TTTCCTGATGGAGAG</u>	39°C	<i>Eco</i> RI
(5) AlfaC	5' CGGCGGCCG <u>CCCTAGGGGATTTGTGATAATAACAAG</u>	49°C	<i>Not</i> I e <i>Avr</i> II
(6) AlfaNot	5' CGGCGGCCG <u>CTAAGGATTTGTGATAATAACAAG</u>	55°C	<i>Not</i> I

Extração de RNA total de hipófise bovina

Para a extração de RNA total de hipófise bovina utilizou-se o reagente Trizol² e seguiram-se todas as instruções presentes no seu manual. Em seguida, após a extração de RNA total, promoveu-se análise do RNA total por eletroferese (com TEB 0,5X) em gel de agarose 0,8 % (feito com solução de TEB 0,5X) com brometo de etídio na concentração de 0,5 µg/mL, ambos *RNAase free*, e procedeu-se, posteriormente, à quantificação da amostra em espectrofotômetro (260 nm).

RT-PCR

A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada utilizando-se o *kit* Superscript³, um sistema de pré-amplificação para a síntese da primeira fita de cDNA. Ao RNA total (~5µg) foram adicionados 0,5µg/µl de oligo dT e água para um volume de 12µl. Essa mistura foi incubada a 70°C por dez minutos e, em seguida, no gelo por um minuto. Foram adicionados à reação 7µl da seguinte solução: tampão de PCR 10X; 2,5 mM de MgCl₂; 0,5 mM de dNTP e 10 mM de DTT. A reação foi homogeneizada e, após uma rápida centrifugação, incubada a 42°C por cinco minutos. A seguir, adicionaram-se 200U da enzima transcriptase reversa (RT). Incubou-se o sistema a 42°C por cinquenta minutos e inativou-se a RT a 70°C por quinze minutos. Após uma centrifugação de um minuto, adicionaram-se 2 U de RNAase H e incubou-se a 37°C por vinte minutos. O sistema contendo a primeira fita de cDNA foi utilizado como *template* para a amplificação pela técnica de PCR.

PCR (reação em cadeia da polimerase)

As PCRs, para a obtenção dos genes da cadeia α e beta, foram realizadas para um volume final de 50µl de reação. Utilizaram-se DNTP (0,2 mM final), tampão de reação 1X final, MgSO₄ (2,5mM), *Taq* DNA polimerase 0,08U/ µl (polimerase de alta fidelidade – Platinum[®] *Taq* DNA

– Invitrogen), *Primer* 5'0,2 pmoles/ µL, *Primer* 3'0,2 pmoles/ µL, *Template* 10ng/ µl. Empregaram-se, como ciclo da reação de PCR, temperatura de desnaturação 94°C por dois minutos, desnaturação novamente a 94°C por um minuto e trinta segundos, anelamento a 53°C por um minuto e trinta segundos, extensão a 68°C por um minuto e trinta segundos, ciclo de 29 vezes, extensão final de 72°C por cinco minutos.

Seqüenciamento e análise de seqüências de DNA

Após cuidadosa análise de restrições dos fragmentos clonados nos vetores pGEM-T e pBluescript II KS, os genes foram enviados para seqüenciamento automático MegaBACE 1000 (Amersham Biosciences) 100ng de DNA (plasmidial ou produto de PCR, sendo neste último caso enviados também cinco picomoles do *primer* específico) num volume de 5 µL. As seqüências obtidas através do seqüenciamento automático foram analisadas quanto à qualidade mediante as ferramentas de bioinformática Phred, Phrap e CAP3, disponíveis no *site* www.unb.br/ib/cel/biomol. Após essa análise, submetiam-se essas seqüências ao BLAST (disponível no *site*: www.ncbi.nlm.nih.gov) para a análise da identidade com as seqüências depositadas no GenBank.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Clonagem dos cDNAs αFSH e βFSH

Como os genes correspondentes às cadeias αFSH e βFSH são de origem eucariótica, é quase certa a presença de íntrons em seu contexto genômico. Para a construção de sistemas de expressão heterólogos, é sempre recomendável realizar a clonagem com o cDNA do gene desejado.

Para se clonar um cDNA, geralmente se constrói um banco de cDNA em um vetor viral, por exemplo, e depois procede-se ao *screening* do banco para o gene desejado. Trata-se de um processo oneroso, laborioso e que exige a disponibilização de sondas genéticas para realizar o *screening*. Uma vez que os genes αFSH e βFSH de *Bos taurus taurus* estão disponíveis no GenBank e dada a semelhança genética entre essa

2 Trizol Reagent – Total RNA Isolation Reagent – GIBCO BRL – Nº de catálogo 15596.

3 SUPERSRIPT™ – Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis – GIBCO BRL®

espécie e *Bos taurus indicus*, é possível clonar os cDNA por uma outra técnica, a RT-PCR. Essa abordagem exige que se tenha RNA total, para depois se proceder a uma reação de síntese de cDNA total, utilizando-se oligo-dT como *primer* e a enzima transcriptase reversa. A fita de cDNA fita simples gerada é suficiente para servir como *template* em uma PCR com *primers* específicos para o gene que se deseja clonar.

Neste trabalho, foi realizado o isolamento de RNA total de hipófises de bovino *Bos taurus indicus*, pois é nessa glândula que se sintetiza o FSH e, portanto, é o local da transcrição das cadeias α FSH e β FSH. No abatedouro de bovinos, extraíram-se as hipófises imediatamente após o abate dos bovinos, para ser evitadas a ação de RNAsases e conseqüentemente a degradação do RNA. A Figura 1 mostra o RNA total de hipófise purificado que foi estimado em 125 ng/ μ l. Após a extração do RNA total, realizou-se a síntese da primeira fita de cDNA, empregando-se, para isso, transcriptase reversa e oligo-dT como *primer*. Após esse procedimento, realizaram-se duas reações de PCR distintas, usando-se *primers* específicos para as cadeias α FSH e β FSH. A seqüência dos *primers* utilizados para essa reação foi baseada nas seqüências publicadas das cadeias α FSH e β FSH de *Bos taurus taurus*, que são descritas no Quadro 1.

A mesma abordagem empregada neste trabalho para isolamento de RNA também foi realizada por ESCH et al. (1986), que extraíram RNA de hipófise bovina (*Bos taurus taurus*) para clonagem e análise da seqüência do cDNA da cadeia β do FSH, e também por ERWIN et al. (1983), para a análise da seqüência do cDNA da cadeia α de *Bos taurus taurus*. A clonagem dos cDNA das cadeias do FSH por RT-PCR ainda foi empregada com sucesso para a obtenção dos cDNAs das cadeias α e β do FSH ovino (FIDLER et al., 1998; FIDLER et al., 2003).

Para a realização da PCR, foram utilizados os *primers* AlfaN e AlfaC, que amplificam uma banda de tamanho esperado de \sim 300 pb correspondente à cadeia α FSH, e os *primers* BetaN e BetaNot, que amplificam uma banda de tamanho esperado de \sim 350 pb da cadeia β FSH. As reações

de PCR geraram amplicons com tamanhos consistentes aos esperados para os cDNA das cadeias α FSH e β FSH de *Bos taurus taurus* (Figura 2). Uma forte evidência era de que os cDNA correspondentes em *Bos taurus indicus* haviam sido amplificados.

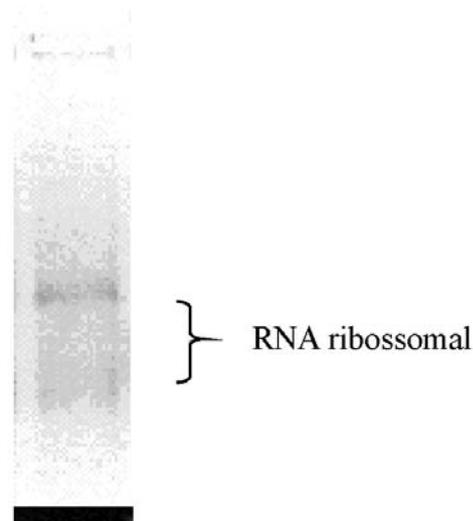


FIGURA 1. Purificação de RNA total de hipófise bovina. Visualização em gel de agarose 0,8% *RNAase free* do RNA total extraído de hipófise. As bandas mais visíveis correspondem aos rRNA.

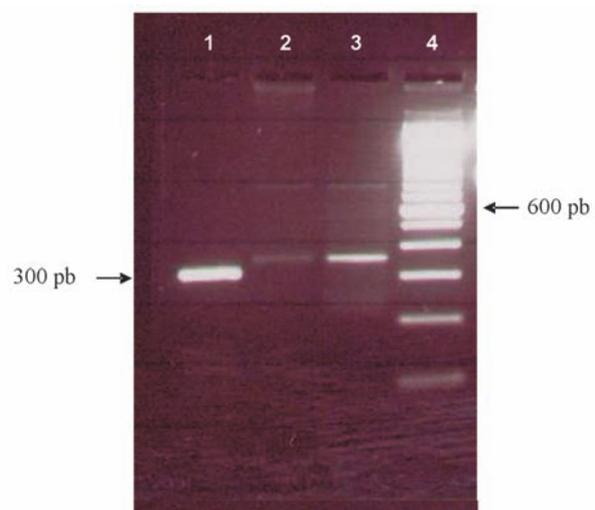


FIGURA 2. Amplificação dos genes α FSH e β FSH. Visualização em gel de agarose 2% dos produtos oriundos da reação de RT-PCR. (1) amplicon do cDNA da cadeia α FSH: \sim 300 pb; (2-3) amplicon do cDNA da cadeia β FSH: \sim 350 pb; (4) marcador 100 pb *ladder* (New England Biolabs).

Após a realização da PCR, purificaram-se as

bandas visualizadas no gel de agarose para ligação aos vetores de clonagem. A banda “ α FSH” foi ligada ao vetor pBlueScript II KS linearizado com *Eco* RV, enquanto que a banda “ β FSH” foi ligada ao vetor pGEM-T. A seguir, realizou-se a transformação de *E. coli* DH5 α , sendo que se plaquearam as células por meio L ágar contendo X-Gal e ampicilina. Consideraram-se as colônias brancas clones positivos e extraiu-se o DNA plasmidial.

Em uma análise preliminar dos plasmídios purificados, fez-se uma PCR com os *primers* Universal e Reverso, para a confirmação da presença de insertos com os tamanhos esperados para os cDNA dos genes α FSH e β FSH (Figura 3). Como esperado, o clone contendo o gene α FSH gerou um amplicon de ~450 pb (~300 pb do gene α FSH + ~150 pb de seqüências do *polilinker* do vetor). Da mesma forma, o clone contendo o gene β FSH gerou um amplicon de tamanho esperado de ~500 pb (~350 pb do β FSH + ~150 pb de seqüências do *polilinker* do vetor).

Após essa confirmação, fez-se o seqüenciamento de cada clone. As Figuras 4 a 7 mostram as seqüências nucleotídicas obtidas assim como a tradução predita correspondentes aos genes das cadeias α FSH e β FSH. Também foi realizada a comparação das seqüências obtidas com outras seqüências homólogas descritas na literatura, mediante o emprego, para isso, do programa BLAST (Figura 5 e 7). Os plasmídios contendo as cadeias α FSH e β FSH foram denominados pBlue α FSH e pGEM β FSH, respectivamente.

Na comparação das seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos da cadeia α FSH de *Bos taurus indicus* com as cadeias α FSH de outras espécies como suínos e búfalo (*Bubalis bubalis*), observou-se que as seqüências são bastante similares, como previamente descrito por ERWIN et al. (1983). A comparação da seqüência da cadeia α FSH de *Bos taurus indicus* com a de suíno demonstrou diferenças em três resíduos de aminoácidos; já na comparação entre as cadeias α FSH de *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*, estas se mostraram idênticas. Essa identidade também foi observada na comparação com a cadeia α de búfalo.

Em relação à comparação das seqüências de nucleotídeos da cadeia β FSH de *Bos taurus indicus*

e *Bos taurus taurus*, identificaram-se cinco modificações localizadas na terceira base do *codon* e que não acarretam alterações das identidades dos aminoácidos correspondentes. Contudo, uma modificação na primeira base do *codon* levou a uma alteração no resíduo do aminoácido 83 que, em *Bos taurus indicus*, é uma glicina, ao invés da serina presente em *Bos taurus taurus*. Essa modificação e todas as outras identificadas na seqüência dos cDNA das cadeias α FSH e β FSH foram confirmadas por uma outra clonagem independente, após uma reação de RT-PCR, o que demonstra que são verdadeiras, e não o resultado de erros aleatórios introduzidos pela Taq Polimerase.

A modificação Ser→Gly na posição 83 foi a única que alterou a identidade do resíduo de aminoácido. Contudo, essa modificação não deve alterar significativamente as propriedades fisiológicas do FSH, uma vez que o resíduo de glicina encontrado nessa posição também é encontrado na cadeia β FSH suína. Trata-se, portanto, de uma mutação particular que distingue as cadeias β FSH de *B. taurus taurus* e *B. taurus indicus*. Essa alteração foi confirmada em outra clonagem (dados não demonstrados).

No total, foi observado que as cadeias α FSH e β FSH de *B. taurus indicus* e suínos apresentam entre si seis diferenças em termos de resíduos de aminoácidos. Uma vez que, atualmente, o extrato de hipófise de suínos é o produto mais utilizado para a indução de superovulação de vacas (BENYEI & BARROS, 2000), essas diferenças na estrutura primária da proteína, associadas à extração desse hormônio de tecido animal, explicam por que bovinos promovem respostas imunológicas contra a presença dessa proteína, exigindo, em aplicações posteriores, maiores dosagens desse extrato (PEREIRA, 1999). Portanto, a partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que: (1) a clonagem do cDNA correspondente às cadeias α FSH e β FSH de *B. taurus indicus* foi realizada com sucesso; (2) as cadeias α FSH maduras de *B. taurus indicus* e *B. taurus taurus* são idênticas; (3) a cadeia α FSH madura de suínos apresenta três resíduos de aminoácidos diferentes com relação à *B. taurus indicus* e *B. taurus taurus*; (4) as cadeias β FSH maduras de *B. taurus indicus* e *B. taurus*

taurus diferem entre si em apenas um resíduo de aminoácido; (5) a cadeia β FSH madura de *B. taurus indicus* apresenta três resíduos de aminoácidos diferentes em relação à de suíno.

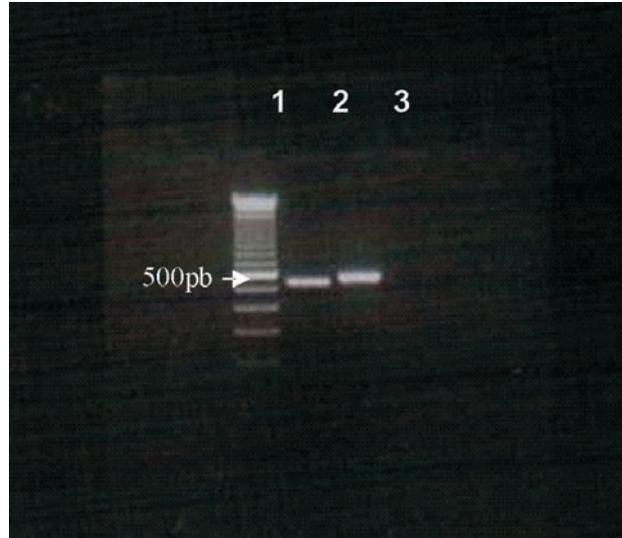


FIGURA 3. Confirmação da clonagem dos genes α FSH e β FSH por PCR. Visualização em gel de agarose 1,2% do resultado da PCR, na qual se usaram como *template* plasmídios recombinantes e os *primers* Universal e Reverso. (1) Marcador 100 pb *ladder* (Gibco BRL); (2) amplicon “ α FSH”: ~450 pb; (3) amplicon “ β FSH”: ~500 pb.

A

```

GAATTC TTTCTGATGGAGAGTTTACAATGCAGGGCTGTCTCTGAATGCAAGCTAAAAGAAAACAAATACTTCT
EcoRI
CCAAGCCAGATGCTCCAATCTATCAGTGCATGGGGTGTCTTCTCCAGGGCATAACCCACTCCAGCGAGGTC

TAAGAAGACAATGTTGGTCCCAAGAACATCACCTCGGAAGCTACATGCTGTGTGGCCAAAGCATTACCAAG

GCCACAGTGTGGGAAATGTCAGAGTGGAGAACCACACCGAGTGCCACTGCAGCACTTGTATTATCACAAAT

CCCTAGGCGGGCCGC
AvrII      NotI
    
```

B

```

1/1                               31/11
TCG GAA TTC TTT CCT GAT GGA GAG TTT ACA ATG CAG GGC TGT CCT GAA TGC AAG CTA AAA
S E F F P D G E F T M Q G C P E C K L K
61/21                               91/31
GAA AAC AAA TAC TTC TCC AAG CCA GAT GCT CCA ATC TAT CAG TGC ATG GGG TGC TGC TTC
E N K Y F S K P D A P I Y Q C M G C C F
121/41                               151/51
TCC AGG GCA TAC CCC ACT CCA GCG AGG TCT AAG AAG ACA ATG TTG GTC CCC AAG AAC ATC
S R A Y P T P A R S K K T M L V P K N I
181/61                               211/71
ACC TCG GAA GCT ACA TGC TGT GTG GCC AAA GCA TTT ACC AAG GCC ACA GTG ATG GGA AAT
T S E A T C C V A K A F T K A T V M G N
241/81                               271/91
GTC AGA GTG GAG AAC CAC ACC GAG TGC CAC TGC AGC ACT TGT TAT TAT CAC AAA TCC TAA
V R V E N H T E C H C S T C Y Y H K S *

SEFFPDGEFTMQGCPECKLKENKYFSKPDAP IYQCMGCCFSRAYPTPARSKKTM LVPKNITSEATCCVAKA
FTKATVMGNVRVENHTEHCSTCYHK S
    
```

FIGURA 4. Seqüência do gene α FSH. (A) Seqüência obtida para o cDNA do gene α FSH (em preto); os sítios de restrição presentes nos *primers* estão coloridos. (B) Tradução predita do gene α FSH de *Bos taurus indicus*.

A

B. indicus TTT CCT GAT GGA GAG TTT ACA ATG CAG GGC TGT CCT GAA TGC AAG CTA AAA GAA AAC AAA
B. taurus TTT CCT GAT GGA GAG TTT ACA ATG CAG GGC TGT CCT GAA TGC AAG CTA AAA GAA AAC AAA
B. bubalis TTT CCT GAT GGA GAG TTT ACA ATG CAG GGC TGT CCT GAA TGC AAG CTA AAA GAA AAC AAA

B. indicus TAC TTC TCC AAG CCA GAT GCT CCA ATC TAT CAG TGC ATG GGG TGC TGC TTC TCC AGG GCA
B. taurus TAC TTC TCC AAG CCA GAT GCT GCA ATC TAT CAG TGC ATG GGG TGC TGC TTC TCC AGG GCA
B. bubalis TAC TTC TCC AAG CCA GAT GCT CCA ATC TAT CAG TGC ATG GGA TGC TGC TTC TCC AGG GCA

B. indicus TAC CCC ACT CCA GCG AGG TCT AAG AAG ACA ATG TTG GTC CCC AAG AAC ATC ACC TCG GAA
B. taurus TAC CCC ACT CCA GCG AGG TCT AAG AAG ACA ATG TTG GTC CCC AAG AAC ATC ACC TCG GAA
B. bubalis TAC CCC ACT CCA GCG AGG TCT AAG AAG ACA ATG TTG GTC CCC AAG AAC ATC ACC TCG GAA

B. indicus GCT ACA TGC TGT GTG GCC AAA GCA TTT ACC AAG GCC ACA GTG ATG GGA AAT GTC AGA GTG
B. taurus GCT ACA TGC TGT GTG GCC AAA GCA TTT ACC AAG GCC ACA GTG ATG GGA AAT GTC AGA GTG
B. bubalis GCC ACA TGC TGT GTG GCC AAA GCA TTT ACC AAG GCC ACA GTG ATG GGA AAT GTC AGA GTG

B. indicus GAG AAC CAC ACC GAG TGC CAC TGC AGC ACT TGT TAT TAT CAC AAA TCC TAA
B. taurus GAG AAC CAC ACC GAG TGC CAC TGC AGC ACT TGT TAT TAT CAC AAA TCC TAA
B. bubalis GAG AAC CAC ACC GAG TGC CAC TGC AGT ACT TGT TAT TAT CAC AAA TCC TAA

B

B. taurus FPDGEFTMQGCPECKLKENKYFSK**PD**APIYQCMGCCFSRAYPTPARSKKTMLVPKNITSEATCCVAKAFT
B. indicus FPDGEFTMQGCPECKLKENKYFSK**PD**APIYQCMGCCFSRAYPTPARSKKTMLVPKNITSEATCCVAKAFT
B. bubalis FPDGEFTMQGCPECKLKENKYFSK**PD**APIYQCMGCCFSRAYPTPARSKKTMLVPKNITSEATCCVAKAFT
 Suíno FPDGEFTMQGCPECKLKENKYFSK**LG**APIYQCMGCCFSRAYPTPARSKKTMLVPKNITSEATCCVAKAFT

B. taurus KATVMGN**VR**VENHTECHCSTCYHKS
B. indicus KATVMGN**VR**VENHTECHCSTCYHKS
B. bubalis KATVMGN**VR**VENHTECHCSTCYHKS
 Suíno KATVMGN**AR**VENHTECHCSTCYHKS

FIGURA 5. Análise comparativa da seqüência nucleotídica e protéica da cadeia α FSH. (A) Alinhamento das seqüências de nucleotídeos correspondentes aos cDNA das cadeias α FSH de *Bos taurus taurus*, *Bos taurus indicus* e *Bubalus bubalis*. Em vermelho, as diferenças. (B) Alinhamento da seqüências protéicas maduras da cadeia α FSH de *B. taurus taurus*, *B. taurus indicus*, *B. bubalis* e suíno. Em vermelho, as diferenças.

A

GAATTCTGCGAGCTGACCAACATCACCATCACGGTGGAGAAAGAGGAATGTGGCTTCTGCATAAGCATCAACACCACGTGG
EcoRI
 TGTGCAGGCTACTGCTACACCCGGGACTTGTTGTACAGGGACCCAGCAAGGCCAACATTCAGAAAACATGTACCTTCAAG

 GAGCTGGTCTACGAGACGGTGAAAGTGCTTGGCTGTGCTCACCATGCAGACTCCCTGTACACGTACCCAGTAGCCACTGAA

 TGTCACTGTGGCAAGTGTGACAGCGACAGCACTGACTGCACCGTGCAGGCCTGGGGCCAGCTACTGCTCCTTCAGGGAA

 ATCAAAGAATAA**GCGGCCGC**
NotI

B

```

1/1                               31/11
TGC GAG CTG ACC AAC ATC ACC ATC ACG GTG GAG AAA GAG GAA TGT GGC TTC TGC ATA AGC
C E L T N I T I T V E K E E C G F C I S
61/21                               91/31
ATC AAC ACC ACG TGG TGT GCA GGC TAC TGC TAC ACC CGG GAC TTG GTG TAC AGG GAC CCA
I N T T W C A G Y C Y T R D L V Y R D P
121/41                               151/51
GCA AGG CCC AAC ATT CAG AAA ACA TGT ACC TTC AAG GAG CTG GTC TAC GAG ACG GTG AAA
A R P N I Q K T C T F K E L V Y E T V K
181/61                               211/71
GTG CCT GGC TGT GCT CAC CAT GCA GAC TCC CTG TAC ACG TAC CCA GTA GCC ACT GAA TGT
V P G C A H H A D S L Y T Y P V A T E C
241/81                               271/91
CAC TGT GGC AAG TGT GAC AGC GAC AGC ACT GAC TGC ACC GTG CGA GGC CTG GGG CCC AGC
H C G K C D S D S T D C T V R G L G P S
301/101
TAC TGC TCC TTC AGG GAA ATC AAA GAA TAA
Y C S F R E I K E *

```

**CELTNITITVEKEEFCISINTTWCAGYCYTRDLVYRDPARPNIQKTCTFKELVYETVKVPGCAHHADSLYT
YPVATCHCGKCDSDSTDCTVRLGLGPSYCSFREIKE**

FIGURA 6. Sequência do gene β FSH. (A) Sequência obtida para o cDNA do gene β FSH; os sítios de restrição presentes nos primers estão coloridos. (B) Tradução predita do gene β FSH de *Bos taurus indicus*.

A

```

B. taurus   TGC GAG CTG ACC AAC ATC ACC ATC ACG GTG GAG AAA GAG GAA TGT GGC TTC TGC ATA AGC
B. indicus  TGC GAG CTG ACC AAC ATC ACC ATC ACG GTG GAG AAA GAG GAA TGT GGC TTC TGC ATA AGC

B. taurus   ATC AAC ACC ACG TGG TGT GCA GGC TAC TGC TAC ACC CGG GAC TTG GTG TAC AGG GAC CCA
B. indicus  ATC AAC ACC ACG TGG TGT GCA GGC TAC TGC TAC ACC CGG GAC TTG GTG TAC AGG GAC CCA

B. taurus   GCA AGG CCC AAT ATC CAG AAA ACG TGT ACC TTC AAG GAG CTG GTC TAC GAG ACG GTG AAA
B. indicus  GCA AGG CCC AAC ATC CAG AAA ACA TGT ACC TTC AAG GAG CTG GTC TAC GAG ACG GTG AAA

B. taurus   GTG CCT GGC TGT GCT CAC CAT GCA GAC TCC CTG TAC ACG TAC CCA GTA GCC ACT GAA TGT
B. indicus  GTG CCT GGC TGT GCT CAC CAT GCA GAC TCC CTG TAC ACG TAC CCA GTA GCC ACT GAA TGT

B. taurus   CAC TGC AGC AAG TGC GAC AGC GAC AGC ACT GAC TGC ACC GTG CGA GGC CTG GGG CCC AGC
B. indicus  CAC TGT GGC AAG TGT GAC AGC GAC AGC ACT GAC TGC ACC GTG CGA GGC CTG GGG CCC AGC

B. taurus   TAC TGC TCC TTC AGG GAA ATC AAA GAA TAA
B. indicus  TAC TGC TCC TTC AGG GAA ATC AAA GAA TAA

```

B

```

B. taurus   CELTNITITVEKEEFCISINTTWCAGYCYTRDLVYRDPARPNIQKTCTFKELVYETVKVPG
B. indicus  CELTNITITVEKEEFCISINTTWCAGYCYTRDLVYRDPARPNIQKTCTFKELVYETVKVPG
Suíno      CELTNITITVEKEEFCISINTTWCAGYCYTRDLVYKDPARPNIQKTCTFKELVYETVKVPG

B. taurus   CAHHADSLYTPVATECHCSKCDSDSTDCTVRLGLGPSYCSFREIKE
B. indicus  CAHHADSLYTPVATECHCGKCDSDSTDCTVRLGLGPSYCSFREIKE
Suíno      CAHHADSLYTPVATECHCGKCDSDSTDCTVRLGLGPSYCSFSEMKE

```

FIGURA 7. Análise comparativa da sequência nucleotídica e protéica da cadeia β FSH. (A) Alinhamento das seqüências de nucleotídeos das cadeias β FSH de *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*. Em vermelho, as diferenças. Sublinhada, a alteração de codon que leva à modificação Ser→Gly observada na cadeia β FSH de *B. taurus indicus*. (B) Alinhamento das seqüências protéicas maduras das cadeias β FSH de *B. taurus taurus*, *B. taurus indicus*, *B. bubalis* e suíno. Em vermelho, as diferenças.

CONCLUSÃO

A clonagem dos cDNA das cadeias α e β do hormônio FSH de *Bos taurus indicus* foi realizada com sucesso. Por se tratar de seqüências inéditas da espécie bovina mais difundida no Brasil, elas podem ser usadas para a produção de FSH no que diz respeito à construção de sistemas de expressão heteróloga desse hormônio.

REFERÊNCIAS

- BENYELI, B.; BARROS, C.C.W. Efeito da superovulação sobre o desempenho de bovinos doadores de embrião importados de clima temperado para clima tropical nos dois primeiros anos de adaptação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.52, n. 4, p.190-196, 2000.
- CUNNINGHAM, J.G. **Tratado de fisiologia veterinária**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.579 p.
- DICKSON, W. **Endocrinologia, reprodução e lactação**. 1996.
- DUCKES, J. **Fisiologia dos animais domésticos**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p. 571-602.
- ERWIN, E.R.; CROYLE, M.L.; DONELSON, J.E; MAURER, R.A. Nucleotide sequence of cloned complementary deoxyribonucleic acid for the alpha subunit of bovine pituitary glycoprotein hormones. **Biochemistry**, v. 22, p.4856-4860, 1983.
- ESCH, F.S.; MASON, A.J.; COOSEY, K.; MERCADO, M.; SHIMASAKI, S. Cloning and DNA sequence analysis of the cDNA for the precursor of the beta chain of bovine follicle stimulating hormone. **Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States Of America**, v. 83, n. 17, p. 6618-6621, 1986.
- FIDLER, A.E.; LUN, S.; YOUNG, W.; McNATTY, K.P. Expression and secretion of a biologically active glycoprotein hormone, ovine follicle stimulating hormone by *Pichia pastoris*. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 21, p.327-336, 1998.
- FIDLER, A.E.; LIN, J.S.; CHIE, W.N.; WESTERN, A.; STENT, V.; McNATTY, K.P. Production of biologically active tethered ovine FSH β by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 30, p. 213-225, 2003.
- FOX, K.M.; DIAS, J.A. VAN ROEY, P. Three-dimensional structure of human follicle-stimulating hormone. **Molecular Endocrinology**, v. 15, n 3, p.378-389, 2001.
- KIM, K.E.; GORDON, D.F.; MAURER, R.A. Nucleotide sequence of the bovine gene for follicle-stimulating hormone β -subunit. **DNA**, v. 7, p. 227-233, 1987.
- MAURER, R.A.; BECK, A.. Isolation and nucleotide sequence analysis of a cloned cDNA encoding the β -subunit of bovine follicle-stimulating hormone. **DNA**, v. 5, p.363-369, 1986.
- NORMAN, A.W.; LITWAK, G. **Hormones**. 2. ed. London: Academic Press, 1997. 558 p.
- PEREIRA, J. C. C. **Melhoramento genético aplicado à produção animal**. Belo Horizonte: Ed. FEP- MVZ, 1999. 496 p.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed. N Y: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 1989
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. v. 1/2, 33. ed. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 2001.
- STABENFEDT, G.H.; EDQVIST, L.E. **Processos reprodutivos na fêmea**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p. 615-644.

Protocolado em: 5 jul. 2007. Aceito em: 9 nov. 2007.