

IX Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

João Pessoa, PB – 20 a 22 de junho de 2012

Análise do polimorfismo *LEP-1620 (A/G)* do gene da leptina e seus efeitos na produção e qualidade do leite de búfalas (*Bubalus bubalis*)¹

Larissa Zetouni², Gregório Miguel Ferreira de Camargo³, Patrícia Dias da Silva Fonseca³, Rusbel Raul Aspilcueta Borquis³, Marcelo Cervini⁴, Humberto Tonhati⁵

¹Parte da dissertação de mestrado da primeira autora, financiada pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

²Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento Animal – FCAV/Unesp-Jaboticabal. Bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). e-mail: lzetouni@gmail.com

³Departamento de Zootecnia/FCAV/Unesp-Jaboticabal

⁴Professor adjunto do Departamento de Ciências Biológicas – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

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

Resumo: O gene responsável pela codificação do hormônio leptina tem sido associado à produção de leite, e diversos polimorfismos encontrados nesse gene foram associados a características produtivas em bovinos. O objetivo do presente estudo foi a identificação do polimorfismo *LEP-1620 (A/G)* no gene bubalino da leptina e suas possíveis associações com as produções de leite, gordura, proteína e porcentagens de gordura e proteína. Foram coletadas amostras de pelo da cauda de 200 búfalas, e após a extração do DNA as amostras foram genotipadas pela técnica PCR-RFLP. Três amostras foram sequenciadas e foi encontrado um SNP na posição 70 do íntron 2 do gene da leptina, caracterizado pela substituição de um A por um G. As médias das produções mensais de leite, gordura, proteína e as porcentagens de gordura e proteína foram avaliadas em um modelo misto. Os genótipos encontrados (AA, AG, GG) foram positivamente correlacionados com as características porcentagem de gordura e de proteína ($p < 0,05$), sendo que os animais AA apresentaram médias superiores para todas as características. As curvas de lactação para as características produção de leite e porcentagens de gordura e proteína apresentaram trajetórias semelhantes para os três genótipos. Esses resultados indicam que o polimorfismo *LEP-1620 (A/G)* pode ser utilizado futuramente como marcador molecular para as características porcentagem de gordura e proteína do leite de búfalas.

Palavras-chave: *Bubalus bubalis*, leptina, polimorfismo, SNP

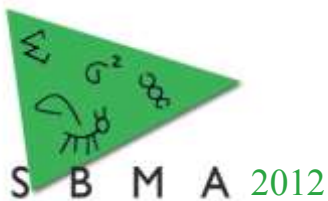
Analysis of *LEP-1620 (A/G)* polymorphism in the leptin gene and their effects on yield and quality of milk from buffalo cows (*Bubalus bubalis*)

Abstract: The gene responsible for encoding the hormone leptin has been associated with milk production, and several polymorphisms of this gene were associated with production traits in cattle. The aim of the present study was to identify the *LEP-1620 (A/G)* polymorphism in the buffalo leptin gene and its possible associations with milk, fat and protein yield, and fat and protein percentages. Samples of tail hair from 200 buffalo cows were collected, and after DNA extraction the samples were genotyped by PCR-RFLP. Three samples were sequenced and an SNP was found at position 70 of intron 2 in the leptin gene, characterized by the substitution of an A for a G. The means from monthly milk, fat and protein yield and fat and protein percentages were evaluated by a mixed model. The genotypes found (AA, AG, GG) were positively correlated with fat and protein percentages ($p < 0,005$), and the AA animals showed the highest means for all traits. The lactation curves for milk yield and fat and protein percentages showed similar trajectories for the three genotypes. These results indicate that the *LEP-1620 (A/G)* polymorphism can be used in the future as a molecular marker for fat and protein percentages traits of buffalo cow's milk.

Keywords: *Bubalus bubalis*, leptin, polymorphism, SNP

Introdução

Estudos sobre estimativas de parâmetros genéticos para a produção de leite e seus constituintes em búfalos tem sido desenvolvidos (ASPILCUETA-BORQUIS et al., 2010), demonstrando valores



IX Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

João Pessoa, PB – 20 a 22 de junho de 2012

moderados de herdabilidade para essas características, indicando que a seleção seria efetiva para o melhoramento genético das mesmas. Com o avanço dos marcadores moleculares veio a oportunidade de utilizá-los para auxiliar no melhoramento genético animal, pois apresentam a vantagem de não sofrerem influências ambientais. Pesquisas tem sido realizadas na tentativa de identificar marcadores moleculares associados aos componentes do leite em búfalas (REN et al., 2011; COSENZA et al., 2009), porém pouco se sabe sobre os efeitos do gene da leptina em búfalos.

O gene da leptina tem sido considerado gene candidato para associação com características de interesse econômico em diversas espécies de animais domésticos, como produção de leite e porcentagem de gordura. Diversos SNPs já foram identificados no gene bovino da leptina, porém estudos sobre esse gene em búfalos são escassos na literatura. Portanto, o objetivo desse trabalho foi verificar a existência do polimorfismo *LEP-1620 (A/G)* em búfalas e suas possíveis correlações com produção de leite e porcentagens de gordura e proteína.

Material e Métodos

Foram utilizadas amostras de pelo da cauda de 200 búfalas para extração de DNA, pela metodologia de Fenol-Clorofórmio-Álcool Isoamílico. As sequências dos *primers* utilizados para amplificação foram 5'- GTC TGG AGG CAA AGG GCA GAG T -3' e 5'- CCA CCA CCT CTG TGG AGT AG -3', descritas por LIEN et al. (1997).

Para a amplificação das regiões de interesse seguiu-se o protocolo da GoTaq® Green Master Mix (Promega), com um volume final de 15µL por reação, e os ciclos de amplificação seguiram o seguinte programa no termociclador: 94°C por 5 min, 94°C por 40 segundos, 62,5°C por 45 segundos e 72°C por um minuto (38 ciclos), e 72°C por 5 minutos.

O produto de PCR foi sequenciado a partir dos *primers* usando a técnica de terminação de cadeia por dideoxynucleotídeos (ddNTPs). Para a análise e identificação dos polimorfismos, as sequências obtidas foram analisadas através do programa CodonCode Aligner.

Para as análises de RFLP, seguiu-se o protocolo fornecido pelo fabricante da enzima (FastDigest® BsaAI – Fermentas), com um volume final de 15µL.

As medidas das produções mensais de leite e as porcentagens de gordura e proteína foram avaliadas em um modelo misto, com uma análise de medidas repetidas no tempo, utilizado o procedimento MIXED do SAS (2000) com a opção *repeated*. Como medida repetida, considerou-se o mês de controle. O modelo utilizado foi: $y = \mu + \text{Touro} + \text{GC} + b_1(I_{ijk} - \bar{I}) + b_2(I_{ijk} - \bar{I})^2 + \text{CML} + \text{gen} + e$

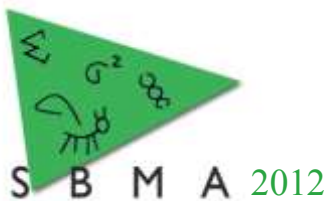
Onde y = variável dependente (produção de leite, gordura e proteína e as porcentagens de gordura e proteína); μ = média geral para a população para as características em estudo; Touro = efeito aleatório do touro; GC = efeito fixo de grupo contemporâneo formado pela o ano e estação de parto (água ou seca); I_{ijk} = efeito da idade da vaca ao parto como covariável; \bar{I} = média da covariável idade; b_1 = coeficiente de regressão linear para idade da vaca ao parto; b_2 = coeficiente quadrático para idade da vaca ao parto; CML = efeito fixo da classe do mês de lactação (1 a 10); gen = efeito fixo do genótipo; e = erro aleatório.

As médias dos valores para os diferentes genótipos foram comparadas utilizando-se o teste de Tukey ($P < 0,05$).

Resultados e Discussão

Os *primers* amplificaram a região de interesse, resultando em um fragmento de 522 pb, presente em partes do íntron 2 e éxon 3 do gene da leptina. Os produtos de PCR foram genotipados por RFLP, e os genótipos encontrados foram AA (522 pb), AG (522 pb, 441 pb e 81 pb) e GG (441 pb e 81 pb). Foram calculadas as frequências genotípicas e a população encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg pelo teste de χ^2 a 5%.

Três produtos de PCR, um de padrão de clivagem, foram sequenciados. O fragmento completo do gene apresentou 522 nucleotídeos e foi detectado um polimorfismo do tipo SNP na posição 70 (íntron 2), caracterizado pela substituição de uma adenina por uma guanina.



IX Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

João Pessoa, PB – 20 a 22 de junho de 2012

O SNP encontrado foi correlacionado com as características produção de leite e porcentagens de gordura e proteína, e os resultados foram significativos para as porcentagens de gordura e proteína, ao nível de 5%. Os animais AA apresentaram médias superiores para todas as características estudadas, e os animais GG apresentaram os menores valores. SOUZA *et al.* (2010) encontraram um valor aditivo do alelo A no polimorfismo *LEP-1620 (A/G)* em animais Nelore, relacionando a presença desse alelo a maiores valores para a característica peso a desmama.

Em relação ao controle nos diferentes meses de lactação, foram estimadas curvas de lactação referentes à produção de leite e às porcentagens de gordura e proteína em função dos genótipos. A produção de leite apresentou pico entre os meses dois e três da lactação e as trajetórias das curvas foram semelhantes entre os três genótipos. O mesmo ocorreu para porcentagem de gordura, porém os animais GG apresentaram uma queda nos valores de porcentagem de gordura a partir do sexto mês de lactação. As curvas de lactação para porcentagem de proteína apresentaram as trajetórias mais destoantes mas com crescimento no mesmo sentido. Os animais GG obtiveram a maior queda nos valores, no terceiro mês de lactação. As curvas de lactação para as porcentagens de gordura e proteína possuem crescimento semelhante, apresentando maiores valores nos meses finais da lactação. Esse fato pode ser explicado visto que, conforme a produção de leite diminui, os sólidos apresentam-se mais concentrados, aumentando suas porcentagens.

Conclusões

No presente estudos, novas informações sobre o polimorfismo *LEP-1620 (A/G)* foram relatadas, demonstrando uma correlação significativa do SNP encontrado nas porcentagens de gordura e proteína do leite de búfalas. Devido a grande importância do hormônio leptina em diversas funções do organismo dos animais, o estudo desse gene e de seus polimorfismos, e suas possíveis associações com outras características de interesse econômico para búfalos se faz necessário, para que melhor possamos entender a função desse gene e seus efeitos na produção da espécie bubalina.

Literatura citada

ASPILCUETA-BORQUIS, R. R.; BIGNARDI, A. B.; SENO, L. O.; CAMARGO, G. M. F.; MUÑOZ-BERROCAL, M.; ALBUQUERQUE, L. G.; DI PALO, R.; TONHATI, H. Genetic parameters for milk yield analyzed by test-day models in Murrah buffaloes in Brazil. **Italian Journal of Animal Science**, v. 9, p. 179–182, 2010.

COSENZA, G.; PAUCIULLO, A.; FELIGINI, M.; COLETTA, A.; COLIMORO, L.; DI BERARDINO, D.; RAMUNNO, L. A point mutation in the splice donor site of intron 7 in the alphas2-casein encoding gene of the Mediterranean River buffalo results in an allele-specific exon skipping. **Animal Genetics**, v. 40, n. 5, p. 791, 2009.

LIEN, S.; SUNDVOLD, H.; KLUNGLAND, H.; VAGE, D. I. Two novel polymorphisms in the bovine obesity gene (OBS). **Animal Genetics**, v.28, p.238–246, 1997.

REN, D. X.; MIAO, S. Y.; CHEN, Y. L.; ZOU, C. X.; LIANG, X. W.; LIU, J. X. Genotyping of the k-casein and β -lactoglobulin genes in Chinese Holstein, Jersey and water buffalo by PCR-RFLP. **Journal of Genetics**, v. 90, n. 1, 2011. Disponível em <<http://www.ias.ac.in/jgenet/OnlineResources/90/e1.pdf>>. Acesso em 13 de abril de 2012.

SAS INSTITUTE. User's guide. Cary: SAS Institute, 2000.

SOUZA, F. R. P.; MERCADANTE, M. E. Z.; FONSECA, L. F. S.; FERREIRA, L. M. S.; REGATIERI, I. C.; AYRES, D. R.; TONHATI, H.; SILVA, S. L.; RAZOOK, A. G.; ALBUQUERQUE, L. G. Assessment of *DGAT1* and *LEP* gene polymorphisms in three Nelore (*Bos indicus*) lines selected for growth and their relationship with growth and carcass traits. **Journal of Animal Science**, v.88, p.435-441, 2010.