

Polimorfismos no éxon 20 do gene receptor da leptina em fêmeas Nelore do Mato Grosso do Sul

André Vieira do Nascimento¹, Lara Endres da Silva², Alexandre Campos Banari², Joyce Azambuja de Oliveira³, Alexéia Barufatti Grisolia⁴, Leonardo de Oliveira Seno⁵

¹Acadêmico do curso de Biotecnologia – Universidade Federal da Grande Dourados/Dourados-MS. Bolsista de Extensão. E-mail: andrevn16@gmail.com

²Acadêmicos do curso de Biotecnologia – Universidade Federal da Grande Dourados/Dourados-MS. Bolsista de Iniciação Científica.

³Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral/Bioprospecção – Universidade Federal da Grande Dourados/Dourados-MS.

⁴Professora Adjunta da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais (FCBA) - UFGD/Dourados-MS.

⁵Professor Adjunto da Faculdade de Ciências Agrárias (FCA) - UFGD/Dourados-MS.

Resumo: O gene do receptor da leptina (LEPR), por *splicing* alternativo, gera diferentes isoformas no receptor de membrana e todas apresentam a mesma porção extracelular se diferindo apenas no tamanho da porção citoplasmática, característica que confere maior ou menor efeito fisiológico da leptina. O objetivo do trabalho foi verificar a ocorrência de polimorfismos no gene receptor da leptina em fêmeas da raça Nelore para futuros estudos de associações relacionadas às características de precocidade sexual. Foi coletado sangue de 72 fêmeas da raça Nelore provenientes de proles de 17 touros, nascidas entre 2004 e 2006. Foi feita a extração de DNA e PCR-RFLP com a enzima *TaqI*. As análises dos dados genéticos foram realizadas com o software CERVUS 3.0. Entre os animais analisados, o genótipo T/T foi identificado em 1 (1,4%), C/T em 24 (33,3%) e C/C em 47 (65,3%) animais, com frequências alélicas de 81,9% para o alelo C e 18% para o alelo T. Os resultados preliminares não indicaram associação entre as médias de idade ao primeiro parto do rebanho e os genótipos resultantes dos polimorfismos identificados. A *TaqI* foi eficiente para caracterização do polimorfismo na posição nucleotídica 115, no éxon 20 do gene receptor da leptina. Estudos posteriores são necessários para proceder uma análise de variância e eventuais associações para características de precocidade sexual.

Palavras-chave: PCR-RFLP, precocidade sexual, seleção animal

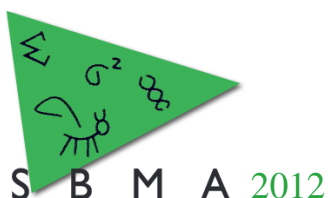
Polymorphisms in exon 20 of leptin receptor gene in Nelore females of Mato Grosso do Sul

Abstract: The leptin receptor gene (LEPR), by alternative splicing, gives rise to various isoforms in the membrane receptor and they all have the same extracellular portion differing only in the cytoplasmic portion size, a characteristic that gives greater or smaller physiological effect of leptin. The aim of this study was to verify the occurrence of polymorphisms in the leptin receptor gene in Nelore female for future studies of associations related to the characteristics of sexual precocity. Blood was collected from 72 Nelore females from offspring of 17 bulls, born between 2004 and 2006. Was performed DNA extraction and PCR-RFLP with the enzyme *TaqI*. The analyzes of genetic data were performed with the software CERVUS 3.0. Among the animals analyzed, the T/T genotype was identified in 1 (1,4%), C/T in 24 (33,3%) and C/C in 47 (65,3%) animals, with allele frequencies of 81,9% to C-allele and 18% to T-allele. Preliminary results indicated no association between the mean age at first calving of the herd and the resulting genotypes of the polymorphisms identified. *TaqI* was effective for the characterization of the polymorphism in position 115, in exon 20 of the leptin receptor gene. Further studies are required to conduct an analysis of variance and possible associations to characteristics of sexual precocity.

Keywords: animal selection, PCR-RFLP, sexual precocity

Introdução

Os receptores da leptina desempenham função primordial para desencadear estímulos celulares na presença do hormônio específico, caso estes receptores apresentem alguma alteração, o indivíduo pode tornar-se resistente a leptina. O gene do receptor da leptina (LEPR) localizado no cromossomo 3 e composto por 20 éxons pode, por *splicing* alternativo, gerar seis isoformas diferentes no receptor de



membrana, onde todas apresentam a mesma porção extracelular, diferindo-se no tamanho da porção citoplasmática, característica que confere maior ou menor efeito fisiológico da leptina (Tartaglia, 1997).

Garcia et al. (2002) demonstraram em pesquisa realizada com novilhas mestiças de raças leiteiras significativa elevação nos níveis de leptina circulante, e expressão do gene *ob* relacionado à proximidade da puberdade das novilhas. Existem diversas técnicas para estudos moleculares, entre elas, a PCR-RFLP (do inglês, *Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism*) se destaca por apresentar alta confiabilidade, eficiência para identificação de polimorfismos e mutações em determinados genes.

O polimorfismo T945M localizado no éxon 20, na posição nucleotídica 115 ocasiona a substituição do nucleotídeo C→T no gene LEPR, altera o aminoácido treonina→metionina, modificando assim, a isoforma do receptor com porção citoplasmática longa (LEPR-b). Essa alteração implica em ineficiência na transdução do sinal químico por uma isoforma curta com capacidade transdutora menor, comprometendo a função hormonal da leptina (Liefers et al., 2004).

Sendo assim, o objetivo desta pesquisa, foi verificar a ocorrência de polimorfismos no gene receptor da leptina em fêmeas da raça Nelore do Mato Grosso do Sul, a fim de contribuir para futuros estudos de associação relacionada às características de precocidade sexual.

Material e Métodos

Foi coletado o sangue de 72 fêmeas da raça Nelore provenientes da fazenda São Jorge do Maracay (Iguatemi, MS) e proles de 17 touros, nascidas entre 2004 e 2006.

O DNA genômico foi extraído de acordo com a metodologia descrita por Crispim et al. (2010). A determinação genotípica foi realizada pela técnica de PCR-RFLP utilizando os *primers* (Forward:5'-GCAACTACAGATGCTCTACTTTTGT-3' e Reverse:5'-CAGGGAAATTTCCCTCAAGTTTCAA-3') de acordo com metodologia descrita por Komisarek & Dorynek (2006). O volume por reação de amplificação foi de 25 µL contendo aproximadamente 50 ng de DNA genômico em 2 µL, 13 µL do Mix de PCR (Fermentas), 1,5 µL de cada *primer* (10pmol/ µL) e 7 µL de H₂O livre de nucleases. As reações consistiram de desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, seguidos de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos e extensão final de 72°C por 5 minutos. Os produtos de PCR foram digeridos por quatro horas a 65°C com 5 unidades da enzima de restrição *TaqI* (Fermentas) e posteriormente submetido a eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo. As análises foram calculadas com o auxílio do software CERVUS 3.0.

Resultados e Discussão

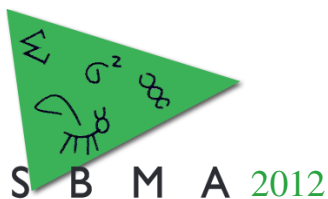
A amplificação por PCR resultou fragmentos do gene LEPR com 400 pb. Após a digestão com a *TaqI*, o alelo C foi clivado em dois fragmentos de 375 pb e 25 pb. A existência de apenas alelo T no genótipo implica em ausência de corte enzimático permanecendo com 400 pb.

A Tabela 1 demonstra os dados das frequências alélicas e genotípicas dos animais, obtidos por meio do programa CERVUS.

Tabela 1 Frequência alélica e genotípica, heterozigosidade observada (Ho) e esperada (He), Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC) e Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) para o polimorfismo na região 115 do éxon 20 do gene receptor da leptina.

Polimorfismo	Freq. Alélica		Freq. Genotípica			Ho	He	HWE	PIC
	C	T	CC	CT	TT				
SNP 115	0,8194	0,1806	0,653	0,333	0,014	0,3333	0,2980	0,4930	0,252

Entre os 72 animais examinados, o genótipo T/T foi identificado em 1 (1,4%), C/T em 24 (33,3%) e C/C em 47 (65,3%) animais, com frequências alélicas de 81,9% para o alelo C e 18% para o alelo T. Os resultados obtidos divergem de estudos anteriores que encontraram frequência alélica de 8% para T e 92% para o C (Komisarek & Dorynek, 2005) e de Liefers et al. (2004) com 4% e 96% para os alelos T e C, respectivamente, ambos os estudo realizados com bovinos da raça Holstein-Friesian. Tal diferença



observada pode ser explicada pelo fato do presente estudo ter realizado a genotipagem de bovinos da raça Nelore e as literaturas citadas terem utilizado bovinos da raça Holstein-Friesian.

O teste de Qui-Quadrado (χ^2) demonstrou que a população do presente estudo se encontra em Equilíbrio de Hardy-Weinberg ($P > 0,05$) para o polimorfismo na posição nucleotídica 115. Tal fato se deve provavelmente por apresentarem animais relativamente heterogêneos para este marcador.

Tabela 2 Valor mínimo (Mi), média (M), valor máximo (Ma) e desvio padrão (DP) para os diferentes genótipos relacionado à Idade ao Primeiro Parto (IPP).

Alelo	Mi	M	Ma	DP
CC	24,3	28,05	33,9	2,9
CT	24,1	27,90	33,8	3,3
TT	-	24,67*	-	-

* Único valor encontrado para o genótipo TT.

Os resultados preliminares não indicaram associação entre as médias de idade ao primeiro parto do rebanho e os genótipos resultantes dos polimorfismos identificados (Tabela 2). Não foi realizada a análise de variância, devido ao fato da existência de apenas um indivíduo genotipado como T/T. Isso pode estar relacionado ao número não suficientemente grande de animais genotipados para a obtenção de variância considerável.

Conclusões

A endonuclease de restrição *TaqI* foi eficiente para caracterização do polimorfismo na posição nucleotídica 115, no exon 20 do gene receptor da leptina.

Estudos futuros serão necessários com maior número de animais, utilização de outros marcadores para proceder análise de variância e eventuais associações para características de precocidade sexual.

Literatura citada

- CRISPIM, B.A. **Avaliação de protocolos para extração de DNA genômico de sangue bovino.** Encontro de Ensino, Pesquisa e Extensão, ENEPE. Dourados, MS. 2010.
- GARCIA, M.R.; AMSTALDEN, M.; WILLIANS, S.W. et al. Serum leptin gene and its adipose gene expression during pubertal development, the estrous cycle, and different seasons in cattle. **Journal of Animal Science**, v.80, p.2158-2167, 2002.
- KOMISAREK J.; DORYNEK Z. Polymorphisms of leptin and leptin receptor genes in the Polish population of Holstein-Friesian bulls. **Annals of Animal Science**, v.5, p.253-260, 2005.
- KOMISAREK, J.; DORYNEK, Z. The relationship between the T945M single nucleotide polymorphism in the leptin receptor gene (LEPR) and milk production traits in Jersey cows. **Animal Science**, v.24, p. 271-277, 2006.
- LIEFERS S.C.; VEERKAMP R.F.; TE PAS M.F. et al. A missense mutation in the bovine leptin receptor gene is associated with leptin concentrations during late pregnancy. **Animal Genetics**, v.35, p.138-141, 2004.
- TARTAGLIA L.A. The leptin receptor. **Journal of Biological Chemistry**, v.272, p.6093-6096, 1997.